

# **Estudio de las variaciones génicas de los sistemas polimórficos HLA y KIR en Leucemia Mieloblástica Aguda**

Study of the genetic variations of the HLA and KIR  
polymorphic systems in Acute Myeloblastic Leukemia

Trabajo de Fin de Grado (21TFG413)

Grado en Biotecnología



## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La leucemia mieloblástica aguda constituye una neoplasia hematológica derivada de la acumulación de elementos celulares indiferenciados infiltrados en sangre, médula ósea y otros tejidos representando el tipo más común en adultos. La vigilancia inmunitaria antitumoral por parte del sistema inmunitario permite prevenir la aparición de cáncer a través de elementos celulares tales como células NK y linfocitos T, mediante receptores KIR y HLA, respectivamente. Se estudiaron los genes KIR y HLA de 312 pacientes y 1164 voluntarios sanos de la región de Castilla y León (España) mediante tecnología Luminex®, basada en reacción en cadena de polimerasa con oligonucleótidos específicos de secuencia; y secuenciación masiva o NGS. Se obtuvieron las frecuencias de los genes HLA y KIR en la población estudiada, siendo *HLA-A\*02:01*, *HLA-B\*44:03*, *HLA-C\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DQB1\*03:01*, *KIR3DL3* y *KIR3DP1* los más frecuentes tanto en pacientes como controles. Los alelos *HLA-C\*12:02*, *HLA-DRB1\*14:01*, *HLA-DQB1\*06:01* y *KIR2DS4* se asociaron con desarrollo de LMA. Pacientes *HLA-B\*53:01* positivos y >65 años presentaron menor supervivencia global. Los genes significativamente asociados al desarrollo de LMA, constituyen mayoritariamente el haplotipo *A\*02:01~B\*52:01~C\*12:02~DRB1\*15:02~DQB1\*06:01*, lo cual puede resultar de gran relevancia clínica.

**Palabras clave:** Leucemia Mieloblástica Aguda, vigilancia antitumoral, células NK, linfocitos T, KIR, HLA.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

Acute myeloblastic leukemia is a hematologic neoplasm derived from the accumulation of undifferentiated cellular elements that infiltrates the blood, bone marrow, and other tissues representing the most common type of cancer in adults. Antitumor immune surveillance performed by the immune system prevents the appearance of cancer, through their cellular elements, such as NK cells and T cells, with their KIR and HLA receptors, respectively. We studied the KIR and HLA genes in 312 patients and 1164 healthy volunteers from the Castilla y León region (Spain) using Luminex® technology, based on a polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotides; and next generation sequencing (NGS). The most frequent HLA and KIR genes observed in both study groups were, *HLA-A\*02:01*, *HLA-B\*44:03*, *HLA-C\*04:01*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DQB1\*03:01*, *KIR3DL3* and *KIR3DP1*. The *HLA-C\*12:02*, *HLA-DRB1\*14:01*, *HLA-DQB1\*06:01*, and *KIR2DS4* alleles were found to be associated with AML development, whereas patients carrying the *HLA-B\*53:01* and >65 years were seen to have a significantly lower overall survival. The genes significantly associated with AML belong to the same haplotype *A\*02:01~B\*52:01~C\*12:02~DRB1\*15:02~DQB1\*06:01*, which it can be of great clinical relevance.

**Keywords:** Acute Myeloblastic Leukemia, antitumoral surveillance, NK cells, T cells, KIR, HLA

## ABREVIATURAS

- ❖ ADN, *ácido desoxirribonucleico*.
- ❖ ARN, *ácido ribonucleico*.
- ❖ FAB, *Clasificación Franco-Americana-Británica*.
- ❖ HLA, *Human Leukocyte Antigen, Antígeno Leucocitario Humano*.
- ❖ IC, *intervalo de confianza*.
- ❖ KIR, *killer cell immunoglobulin-like receptors, receptores similares a las inmunoglobulinas de células NK*.
- ❖ MHC, *Major Histocompatibility Complex, Complejo Principal de Histocompatibilidad*.
- ❖ LMA, *Leucemia Mieloblástica/Mieloide Aguda*.
- ❖ MO, *médula ósea*.
- ❖ NGS, *next generation sequencing, secuenciación masiva o de nueva generación*.
- ❖ NK, *natural killer, células asesinas o NK*.
- ❖ OMS, *Organización Mundial de la Salud*.
- ❖ OR, *Odd ratio*.
- ❖ PCR, *polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa*.
- ❖ RC, *remisión completa*.
- ❖ REDMO, *Registro Español de Donantes de Médula Ósea*.
- ❖ RR, *riesgo relativo*.
- ❖ TCR, *receptores antigénicos de célula T*.
- ❖ alo-TPH, *trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*.

*Mi más sincero agradecimiento a todos los pacientes que se prestaron a participar y a todas las personas del grupo de investigación en Biología Molecular y HLA del Servicio de Hematología, facultativos adjuntos y técnicos de laboratorio, en especial a Isabel, Pilar, Ariadna y Ana, por su dedicación y esfuerzo.*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1.1. Aspectos generales de la leucemia mieloide aguda</b>	6
<b>1.2. Respuesta inmunitaria</b>	8
1.2.1. Mecanismos de vigilancia inmunitaria antitumoral	9
1.2.2. Respuesta inmunitaria innata antitumoral	9
1.2.3. Respuesta inmunitaria adaptativa antitumoral	12
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	15
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
<b>3.1. Sujetos de estudio</b>	16
<b>3.2. Obtención y extracción del ADN</b>	16
<b>3.3. Genotipado de genes KIR con el kit LIFECODES® KIR-SSO en plataforma Luminex®</b>	16
<b>3.4. Tipaje en alta resolución de genes HLA mediante secuenciación masiva con el kit NGSGo® MX6-1 en plataforma Illumina® MiniSeq™</b>	17
<b>3.5. Análisis estadístico</b>	20
<b>4. RESULTADOS</b>	22
<b>4.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes</b>	22
<b>4.2. Estudio de polimorfismos HLA de clase I y clase II</b>	22
4.2.1. Frecuencias alélicas, fenotípicas y haplotípicas de HLA	22
4.2.2. Asociación de las variaciones genéticas HLA con el desarrollo de LMA	25
4.2.3. Estudio de las variaciones genéticas HLA y supervivencia global en pacientes con LMA	25
<b>4.3. Estudio de polimorfismos KIR</b>	28
4.3.1. Asociación de los polimorfismos KIR con en el desarrollo de LMA	28
4.3.2. Estudio de polimorfismos KIR y mortalidad en pacientes con LMA	29
<b>5. DISCUSIÓN</b>	30
<b>6. CONCLUSIONES</b>	33
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	34



## 1. INTRODUCCIÓN

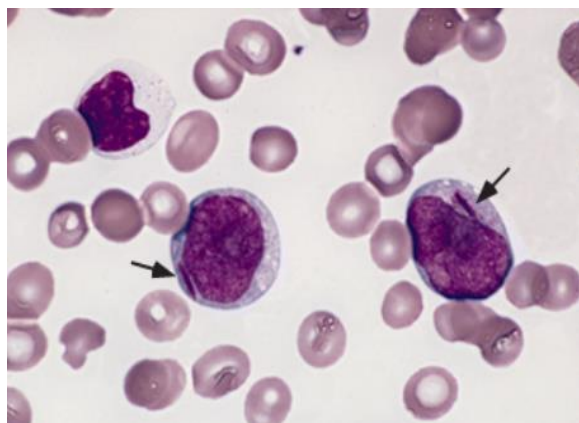
### 1.1. Aspectos generales de la leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) constituye un grupo relativamente bien definido de neoplasias hematológicas que resultan de la expansión y proliferación clonal, como consecuencia de una serie de cambios genéticos, de células progenitoras de estirpe mieloide con capacidad de división, pero sin capacidad de diferenciación hacia elementos celulares más maduros, que se acumulan e infiltran la sangre, médula ósea y otros tejidos <sup>(1,2)</sup>. Como resultado de la acumulación de estos blastos leucémicos en médula ósea, se objetiva una reducción variable en la hematopoyesis de otros elementos formes de la sangre, como hematíes, plaquetas o granulocitos, derivando en una serie de consecuencias sistémicas, tales como anemia, sangrado y aumento del riesgo de infecciones <sup>(3,4)</sup>.

Aunque la mayoría de los casos de LMA son idiopáticos, en la etiopatogénesis de este trastorno intervienen diversos factores, como la predisposición genética, mutagénesis asociada a radiación y el contacto con sustancias químicas y fármacos<sup>(5)</sup>. La LMA es la leucemia aguda más común en adultos llegando a representar aproximadamente el 80% de casos en este grupo de edad, aumentando su incidencia en aquéllos mayores de 65 años, con un ratio de hombre-mujer de 5:3 sin apreciarse diferencias entre razas<sup>(6,7)</sup>.

El cuadro clínico en pacientes con LMA consiste en una serie de síntomas inespecíficos relacionados con las complicaciones derivadas de la pancitopenia (anemia, neutropenia y trombopenia) tales como fatiga, fiebre, debilidad, pérdida de peso, dolor óseo y hemorragias, además de posibles infecciones de diferente severidad<sup>(8)</sup>; siendo la piel, ganglios linfáticos, tubo digestivo y testículos, entre otros, son los tejidos más afectados<sup>(5)</sup>.

A pesar de los avances de la biología molecular aplicada al diagnóstico de LMA, el estudio morfológico por microscopía a partir de muestra de aspirado de MO, sigue siendo clave para su diagnóstico, requiriéndose de al menos un 20% de blastos en MO para establecerlo (Figura 1), clasificando a las LMA en diferentes subtipos, desde el M0 al M7, basado en criterios morfológicos y citoquímicos<sup>(9,10)</sup>. No obstante, actualmente los



**Figura 1.** Mieloblastos con bacilos de Auer, señalados con flecha, en leucemia mieloide aguda. Imagen extraída de Jonathan E Koltz, 2019.

estudios moleculares son una herramienta fundamental para aumentar el grado de personalización en el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de la LMA. De hecho, en la actualidad la clasificación

de las LMA que se sigue es la propuesta por la OMS (última versión 2016) que integra datos morfológicos, inmunológicos y citogenéticos/moleculares<sup>(11)</sup>.

El uso de técnicas moleculares convencionales basadas en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) y secuenciación de Sanger, la cuantificación de fusiones cromosómicas mediante PCR en tiempo real cuantitativa en ADN (qPCR) o ARN (rt-qPCR) en combinación con metodologías más modernas como la secuenciación masiva o NGS (del inglés “*next generation sequencing*”), junto con el estudio del cariotipo, han permitido establecer un algoritmo de estratificación del riesgo propuesto por la European Leukemia Net (ELN) en 2017 clasificando a los pacientes en tres grupos (favorable, intermedio y adverso) teniendo en cuenta las alteraciones genéticas y moleculares que han demostrado tener impacto pronósticos<sup>(12,13)</sup>. Por ello la combinación de estudios morfológicos, moleculares y en última instancia de inmunofenotipo<sup>(14)</sup> son fundamentales hoy en día en el diagnóstico de pacientes con LMA.

En lo relevante al tratamiento en la LMA, la remisión completa (RC) es el objetivo primordial en la mayoría de los casos, utilizando para ello estrategias de mayor o menor intensidad. El éxito del tratamiento viene condicionado en gran parte por las mejoras introducidas en los cuidados de soporte que permiten prevenir, anticipar y minimizar los efectos tóxicos (por ej., síndrome de lisis tumoral, mielosupresión, infecciones, toxicidad gastrointestinal, hepática, renal etc...) derivados de dichas terapias reuniendo todas las medidas comúnmente adoptadas durante el tratamiento de las leucemias agudas y de sus efectos secundarios<sup>(12)</sup>.

Las quimioterapias intensivas siguen siendo la base fundamental del tratamiento para curar la LMA en dos grupos de pacientes ateniendo a la edad; pacientes *fit* (<65 años y sin comorbilidades) y pacientes *borderline* (>60-70 años candidatos elegibles para terapia con intención curativa)<sup>(4)</sup>. Este tratamiento tiene dos objetivos divididos en dos fases principales: tratamiento de inducción para alcanzar la RC, seguido del tratamiento post-remisión destinado a erradicar el clon leucémico residual, denominado tratamiento de consolidación o intensificación, tras el cual se evalúa la respuesta al mismo con un nuevo aspirado de MO. La evaluación de la respuesta puede ser a) RC (basada en criterios morfológicos con MO evaluable con <5% blastos, sin bastones de Auer ni blastos circulantes), b) remisión completa con recuperación incompleta (RCi) (RC, pero con trombocitopenia residual, plaquetas <100x10<sup>9</sup>/L); c) RC con enfermedad mínima residual negativa (RC<sub>EMR-</sub>); d) remisión parcial (RP) (RC, pero con blastos leucémicos en MO entre 5%-25%) y e) médula aplásica sin blastos morfológicos ni recuperación periférica. Además de las diferentes respuestas al tratamiento intensivo, el paciente puede no responder (refratariedad 1ª) o presentar recidiva leucémica.



En función de la respuesta tras el tratamiento quimioterápico intensivo, atendiendo al tipo de LMA y de alteración genética (*NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *TP53*, *RUNX1*, cariotipo), así como del riesgo de mortalidad asociada al trasplante (MRT), se puede considerar a los pacientes con LMA en primera RC elegibles para trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), con donante familiar o no HLA idéntico, ya que la incidencia de recaída sin alo-TPH es del 60%-40%. La utilización de donantes con incompatibilidad parcial HLA o células madre de cordón umbilical expanden la reserva de donantes potenciales en el caso de no disponer de donante HLA idéntico, aunque cada vez más se está expandiendo el uso de donantes haploidénticos en su lugar. El alo-TPH es la opción preferible versus el TPH autólogo, especialmente en menores de 60 años, ya que se ha demostrado que proporciona un efecto injerto contra leucemia importante, pero puede conllevar cierta toxicidad a corto y largo plazo, como la enfermedad de injerto contra huésped, que se contrarresta con inmunosupresión<sup>(7,15)</sup>.

## **1.2. Respuesta inmunitaria**

Durante la década de los 50, se desarrolló el concepto de vigilancia inmunitaria del cáncer por Macfarlane Burnet, el cual expone la idea del reconocimiento por parte del sistema inmunitario de células transformadas para destruirlas e impedir el desarrollo tumoral<sup>(16)</sup>. En animales vertebrados, la respuesta inmunitaria (RI) está compuesta por dos tipos diferenciados, pero no excluyentes; 1) la inmunidad innata y 2) la inmunidad adaptativa.

La **inmunidad innata** es responsable de causar inflamación en los lugares de infección tras el reconocimiento de los llamados patrones moleculares conservados en patógenos (PAMP) o células dañadas (DAMP) y puesta en marcha de los mecanismos celulares y humorales efectores. La RI innata ocurre en un tiempo de reacción temprano de horas, no presenta memoria inmunológica y consta de un número limitado de receptores codificados por la línea germinal permitiendo discriminación entre lo propio y lo extraño. Los principales componentes celulares de la inmunidad innata son a) fagocitos (monocitos-macrófagos y neutrófilos), b) células dendríticas y c) las células asesinas naturales o NK (del inglés “*natural killer*”), entre otros (basófilos, eosinófilos, mastocitos, etc...); mientras que la respuesta humoral está principalmente formada por a) el sistema del complemento y b) mediadores solubles (citocinas y quimiocinas), entre otros elementos solubles.

Tras la activación de la inmunidad innata, se ponen en marcha mecanismos específicos para la activación de la **inmunidad adaptativa**, cuya acción ocurre de forma más tardía con una duración de días a semanas. La inmunidad adaptativa presenta una enorme especificidad antigénica debido a la presencia de un número elevado de receptores antigénicos generados por recombinación somática, capaces de discriminar de forma muy fina diferencias moleculares mínimas entre diferentes

patógenos frente a lo propio, y genera memoria inmunológica. Los principales tipos celulares de la RI adaptativa son los linfocitos T y B; y sus principales mecanismos humorales, las citocinas y los anticuerpos<sup>(17)</sup>.

#### *1.2.1. Mecanismos de vigilancia inmunitaria antitumoral*

El sistema inmunitario realiza una vigilancia estrecha en el organismo en su búsqueda de lo extraño, de modo que, si una célula experimenta algún cambio molecular producto de mutaciones génicas, dichos cambios pueden ser detectados por las células del sistema inmunitario innato y adaptativo pudiendo de este modo eliminar la(s) célula(s) transformada(s), evitando su proliferación y la consecuente aparición de cáncer.

Este concepto de vigilancia inmunológica se ha postulado como una de las principales funciones antitumorales del sistema inmunitario, a través del cual, mediante el uso de receptores de membrana presentes en las células NK y linfocitos T se ponen en marcha mecanismos efectores específicos para la eliminación de las células transformadas. A continuación, se describen dichas respuestas inmunitarias antitumorales junto sus principales elementos celulares responsables de llevarlas a cabo.

#### *1.2.2. Respuesta inmunitaria innata antitumoral*

Las células NK, constituyen uno de los componentes especializados más relevantes del sistema inmunitario innato, y presentan características citotóxicas e inmunorreguladoras. Estos linfocitos citotóxicos son granulares, de mayor tamaño que linfocitos T y no necesitan maduración tímica como los linfocitos T. Se diferencian a partir de precursores CD34+ presentes en MO e hígado fetal y necesitan de la citocina IL-15 para su activación, proliferación y supervivencia<sup>(18)</sup>. Este tipo celular representa el 10-20% de las células mononucleadas de la sangre periférica, y se encargan principalmente de la respuesta frente a células malignas e infectadas por virus<sup>(19)</sup>.

La función citotóxica de las células NK está regulada mediante un equilibrio entre señales generadas por receptores activadores e inhibidores, de tal manera que los activadores, con dominios intracitoplasmáticos ITAM (del inglés “*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*”), reconocen ligandos en células que deben ser eliminadas y los inhibidores, con dominios intracitoplasmáticos ITIM (del inglés “*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*”) reconocen células sanas a conservar. Para la realización de su actividad citotóxica, las células NK liberan el contenido de sus gránulos, formado por granzimas y perforinas, en la sinapsis inmunológica formada con la célula diana induciendo su apoptosis, entre otras funciones como la liberación de IFN- $\gamma$ <sup>(18)</sup>.

Dentro de la familia de receptores inhibidores, encontramos un grupo de receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas llamados receptores KIR (CD158) (del inglés “*killer cell immunoglobulin-like receptors*”), aunque dentro de esta también hay receptores KIR activadores.

Los receptores KIR reconocen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés “*Major Histocompatibility Complex*”) o HLA en humanos (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*) de clase I, que son proteínas transmembrana de tipo I pertenecientes a la superfamilia de receptores de tipo inmunoglobulina, expresadas por todas las células nucleadas. Las células NK reconocen específicamente la presencia de sus ligandos HLA de clase I sobre las células produciéndose la inhibición de la actividad lítica, protegiendo lo propio<sup>(18)</sup>. Cuando las células diana no expresan HLA de clase I en la membrana celular, como por ejemplo en las células tumorales, las células NK se activan y ejercen su actividad citotóxica sobre las mismas<sup>(16)</sup>.

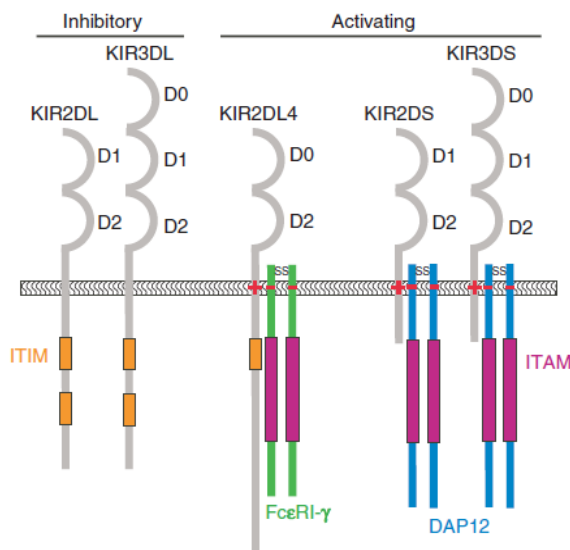
Uno de los receptores activadores más estudiados en las células NK, a parte de algunos receptores KIR activadores, es el miembro D del grupo 2 de receptores activadores de célula NK o NKG2D (CD134) perteneciente a la familia de receptores de lectinas de tipo C, cuyo ligando son proteínas relacionadas con el HLA de clase I de expresión inducible por células estresadas o tumorales llamadas MICA o MICB<sup>(20)</sup>.

Aunque no son objeto de estudio en el presente trabajo, los receptores NKG2D están implicados en respuestas inmunitarias antitumorales, y actualmente se están llevando a cabo estudios preclínicos para su uso en inmunoterapia del cáncer<sup>(21)</sup>.

#### 1.2.2.1. Organización genómica y estructura molecular de los receptores KIR

Los receptores KIR son un grupo de glucoproteínas transmembrana con función reguladora expresada principalmente por las células NK, entre otros grupos celulares. El locus KIR contiene una familia de genes polimórficos y altamente homólogos codificados en el cromosoma 19 (19q13.4) dentro del llamado complejo del receptor del leucocito. Esta familia consiste en un grupo de 15 genes (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3) y 2 pseudogenes (KIR2DP1 y KIR3DP1)<sup>(22)</sup>. Estos genes presentan variabilidad alélica, se heredan como grupos de alelos de manera conjunta procedentes de un mismo progenitor formando haplotipos con un patrón estocástico, lo que significa que miembros de una misma familia pueden diferir en el contenido de genes KIR heredados. Estas características son responsables de la variabilidad y diversidad de los genes KIR observada en la población<sup>(16,19)</sup>.

Como se muestra en la Figura 2, la estructura proteica de los receptores KIR difiere tanto en el número de dominios de inmunoglobulina que forman la porción extracelular, como en la longitud de los tallos intracitoplasmáticos en función de si son activadores o inhibidores. Si el receptor KIR cuenta con dos dominios extracelulares de inmunoglobulina se denominan 2D, y si posee tres dominios, 3D, independientemente de si son activadores o inhibidores.



**Figura 2.** Estructura molecular entre diferentes miembros de la familia KIR. Se muestran tres subgrupos principales: receptores inhibidores KIR2DL y KIR3DL; receptores activadores KIR2DS y KIR3DS, y un receptor de activación único KIR2DL4. Imagen tomada de *Campbell & Purdy, 2011*.

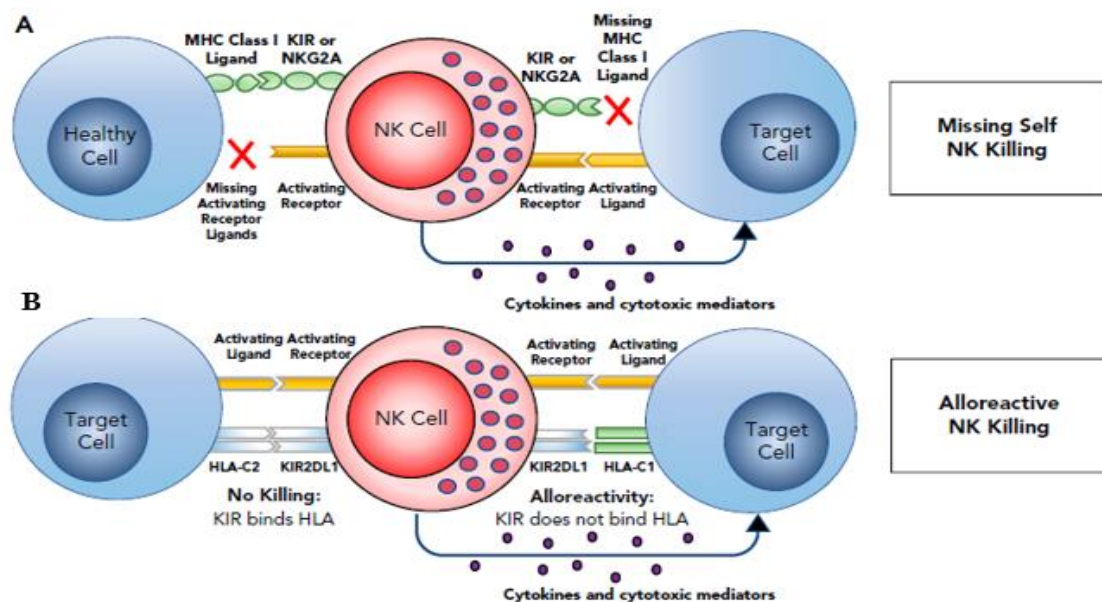
En cuanto a la longitud del tallo citoplasmático, los KIR inhibidores presentan tallos largos (L, del inglés “*long*”) con motivos ITIM, y si son KIR activadores presentan tallos cortos (S, del inglés “*short*”) asociados a secuencias ITAM acoplados a la proteína adaptadora DAP12 responsable de transducir la señal al interior de la célula. Existe una excepción, KIR2DL4, receptor activador con tallo largo (L) y motivo ITIM<sup>(23)</sup>. Como se mencionó anteriormente, el principal ligando de los receptores KIR son las moléculas HLA de clase I, principalmente HLA-C, aunque también ciertos alelos HLA-A y HLA-B y la función atribuida a estos receptores es el control de la respuesta de las células NK.

Existen evidencias que indican que la presencia o ausencia de determinados polimorfismos KIR se asocian con determinados estados patológicos o una mayor supervivencia en receptores de trasplante haploidéntico al favorecer una menor probabilidad de recaída por el efecto injerto contra leucemia<sup>(24,25)</sup>.

El efecto beneficioso asociado a ciertos polimorfismos KIR que se observa en receptores de trasplante haploidéntico se explica por la teoría de la educación de las células NK frente a lo propio (Figura 3), que se pierde cuando se trasplantan células hematopoyéticas de un donante con KIR inhibidores cuyos ligandos HLA de clase I están ausentes en el receptor, de modo que las células NK del donante, tras generarse por la hematopoyesis en el receptor, son alorreactivas y no se verían inhibidas ante la presencia de células tumorales residuales del receptor. Sin embargo, la presencia de células NK alorreactivas en pacientes trasplantados haploidéntico se asocian con mortalidad asociada con mayor incidencia de enfermedad de injerto contra hospedador y de infecciones<sup>(23,26,27)</sup>. Del mismo modo, la transformación maligna de las células promueve su propia destrucción, mediante la función

citotóxica de las células NK, debido a una regulación a la baja de la expresión de moléculas HLA de clase I que ocurre en células tumorales (mecanismo de evasión tumoral de la respuesta inmunitaria adaptativa) y evita la unión con receptores KIR inhibidores, como explica la teoría de la pérdida de tolerancia a lo propio o “*missing self*”<sup>(19)</sup>.

Estos aspectos funcionales de las células NK se utilizan en la clínica para manipular el trasplante haploidéntico, de manera que los inmunólogos, mediante el estudio de polimorfismos KIR y HLA en el paciente candidato a trasplante y en sus posibles donantes, recomiendan al donante idóneo por presentar potencialmente células NK alorreactivas debido a la presencia de incompatibilidades KIR-ligando en dirección injerto contra hospedador, de modo que se desencadene la destrucción de las posibles células tumorales residuales previniendo la recaída de la enfermedad.



**Figura 3. A)** Inhibición de célula NK al reconocer HLA de clase I el receptor KIR inhibitorio (Tolerancia) y acción sobre células maligna por ausencia de HLA de clase I y activación de célula NK (Destrucción por pérdida de lo propio); **B)** Diferente acción de célula NK frente a células diana por compatibilidad/incompatibilidad del ligando HLA-C de células diana con receptor KIR, mecanismo explotado en trasplante de progenitores hematopoyéticos para eliminar células tumorales mediante incompatibilidad con receptor KIR del donante. Imagen tomada de *Cooley et al., 2018*.

### 1.2.3. Respuesta inmunitaria adaptativa antitumoral

Los actores principales en este tipo de respuesta son los linfocitos T, los cuales se dividen en linfocitos T CD4+ o CD8+ atendiendo a sus funciones efectoras. La principal función de los linfocitos T CD4+ es la de liberar citocinas que regulan la función de otras células del sistema inmunitario colaborando con la destrucción de patógenos; es por ello por lo que se les denomina Linfocitos T CD4+ colaboradores (LTh). Los linfocitos T CD8+ presentan funciones citotóxicas mediadas por granzimas y perforinas, al igual que las células NK, de modo que reciben el nombre de Linfocitos T

CD8+ citotóxicos (LTc). La principal función de los LTc es la protección frente a infecciones virales y la vigilancia inmunitaria anti-tumoral<sup>(28)</sup>.

La activación de los linfocitos T CD8+ y CD4+ requiere del reconocimiento, mediante la interacción de sus receptores antigénicos de célula T o TCRs, de fragmentos peptídicos llamados antígenos con capacidad inmunógena presentados por proteínas HLA de clase I y clase II en la superficie de células presentadoras de antígenos, respectivamente<sup>(17,29)</sup>. Las proteínas HLA también tienen una función primordial en el mecanismo de tolerancia central del sistema inmunitario que tiene lugar durante la maduración de los linfocitos T en el timo, seleccionando positivamente a linfocitos T capaces de reconocer con baja afinidad complejos de péptido propio-HLA propio y eliminando por apoptosis a linfocitos T que reconocen con alta afinidad complejos péptido propio-HLA propios potencialmente autorreactivos<sup>(30)</sup>.

#### 1.2.3.1. Estructura molecular y organización genómica del HLA

En humanos el Complejo Principal de Histocompatibilidad o MHC recibe el nombre de sistema de antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés “*Human Leukocyte Antigen*”) por su expresión en leucocitos<sup>(31)</sup>. Este sistema se encuentra codificado en el cromosoma 6 (6p21.3) y constituye la región cromosómica más polimórfica de todo el genoma humano<sup>(32)</sup>. El HLA se hereda con un patrón de herencia mendeliano de codominancia, indicando que cada individuo expresará todos los genes heredados de ambos progenitores. Los genes HLA presentan un fenómeno denominado *desequilibrio de ligamiento*, que indica que ciertos genes HLA en un mismo cromosoma forman haplotipos que se heredan más frecuentemente que si ocurriese completamente al azar<sup>(33)</sup>.

El HLA contienen dos regiones con grupos de genes, la región de clase I y la de clase II, que codifican grupos de proteínas con estructuras y funciones similares; mientras que existe una región clase III encargada de codificar proteínas responsables de regular ciertas funciones del sistema inmunitario. La región genómica de la clase I se divide en dos subregiones, la clásica que contiene un grupo de 3 genes muy polimórficos (HLA-A, -B y -C); y la no clásica con genes menos polimórficos (HLA-E, -F y -G). De igual forma, la región codificante de la clase II contiene los genes de HLA-DRA y -DRB, HLA-DQA y -DQB, HLA-DPA y -DPB, además de otros como DM y DO. Los productos de estos genes dan lugar a grupos de proteínas denominados isotipos (Figura 4)<sup>(17,32)</sup>.

La estructura molecular de las proteínas HLA de clase I y clase II difieren en cuanto a la composición de sus cadenas polipeptídicas, pero forman una configuración tridimensional similar con funciones similares de presentación antigénica a los linfocitos T tras su expresión en la superficie

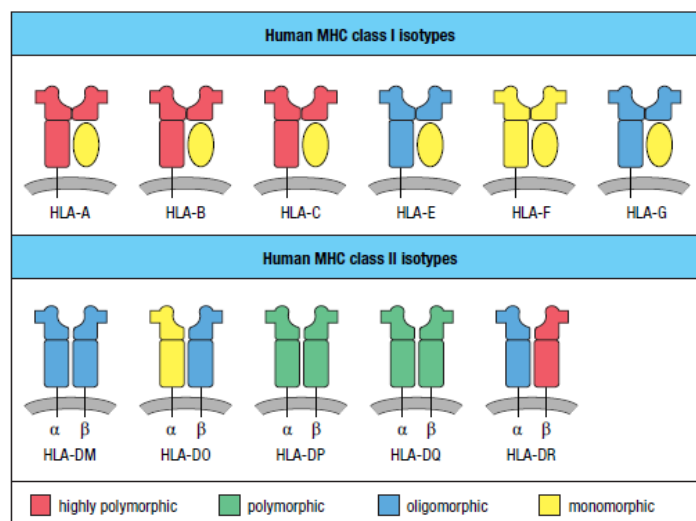


celular. Las moléculas HLA de clase I presentan péptidos antigénicos a los linfocitos CD8<sup>+</sup> y las de clase II a linfocitos CD4<sup>+</sup><sup>(29)</sup>.

Las moléculas HLA de clase I son proteínas transmembrana de clase I heterodiméricas formadas por una cadena pesada  $\alpha$  polimórfica y codificada por el locus HLA con tres dominios de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular. Los dos dominios más alejados de la membrana plasmática ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) forman la hendidura de unión al péptido, mientras que el dominio  $\alpha 3$  se une físicamente con la proteína CD8 de

los LTc, restringiéndoles por el HLA de clase I. Además, la molécula HLA clase I contiene una cadena ligera  $\beta$  no polimórfica codificada en el cromosoma 15, llamada  $\beta 2$ -microglobulina, que se asocia al dominio  $\alpha 3$  para estabilizar el plegamiento completo de las moléculas HLA de clase I. Las moléculas HLA de clase II son también proteínas transmembranas de tipo I heterodiméricas formadas por dos cadenas polimórficas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) codificadas en el locus HLA. La hendidura de unión al antígeno está formado por los dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , mientras que el dominio  $\beta 2$  se interacciona con CD4 de los LTh durante la presentación antigénica, restringiéndoles por el HLA de clase II<sup>(32)</sup>. Las moléculas HLA de clase I se expresarán en todas las células somáticas nucleadas, pero con niveles variables de expresión según el tejido; además su expresión se ve influenciada por citoquinas durante procesos inflamatorios. Las moléculas de HLA de clase II se expresa de forma constitutiva en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, monocitos, macrófagos y Linfocitos B) y endotelio vascular, pero los Linfocitos T pueden expresar HLA de clase II tras su estimulación por ciertas citocinas como TNF- $\alpha$ <sup>(17)</sup>. Como se describió antes, las moléculas HLA de clase I actúan como ligandos de los receptores KIR regulando la actividad citotóxica de las células NK.

Las células tumorales que expresan HLA de clase I pueden ser objetivo de los LTc; sin embargo, los tumores reducen su expresión de HLA, lo que favorece la acción de las células NK para destruir el tumor, al no recibir la inhibición por HLA de clase I por parte de sus receptores KIR.



**Figura 4.** Isotipos humanos HLA. Difieren en función y nivel de polimorfismo mostrado en los cuadros de colores. La cadena  $\alpha$  en HLA-A, HLA-B y HLA-C es polimórfica que se une a la  $\beta 2$ -microglobulina monomórfica. HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP está formado por dos cadenas polipeptídicas que difieren en su grado de polimorfismo. Imagen tomada de Parham, 2015.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis de la que surge este trabajo es que el polimorfismo existente en los genes HLA y KIR se asocian con un aumento en el riesgo de desarrollar LMA afectando a su supervivencia, o si por el contrario presentan un efecto protector frente a la misma.

El objetivo general de este trabajo es analizar las variaciones genéticas en HLA y KIR en una cohorte de pacientes diagnosticados de LMA y de controles sanos, y correlacionar la presencia de un determinado polimorfismo genético KIR y/o HLA con características clínicas y supervivencia global de los pacientes. Para ello se van a desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Caracterizar genotípicamente tanto pacientes de LMA como donantes de médula ósea, tomados como grupo control, para los genes KIR y HLA de clase I y clase II.
- ❖ Determinar las frecuencias genotípicas, fenotípicas y haplotípicas en pacientes de LMA y donantes para los genes KIR y HLA, destacando los alelos, genes y/o haplotipos más frecuentes.
- ❖ Establecer los polimorfismos KIR y HLA que pueden resultar significativos en el desarrollo de LMA, comparando genotipos de pacientes y controles sanos.
- ❖ Establecer los polimorfismos KIR y HLA que puedan asociarse significativamente con las características clínicas de los pacientes: edad, sexo, clasificación LMA.
- ❖ Estudiar la asociación entre los polimorfismos HLA y KIR con la supervivencia global de nuestra serie de estudio.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Sujetos de estudio**

En este estudio se han incluido un total de 312 pacientes diagnosticados de LMA en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca durante los años 2010 a 2020. Adicionalmente, se han utilizado un total de 1164 individuos voluntarios para la donación de progenitores hematopoyéticos procedentes del Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO) como controles sanos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Área de Salud de Salamanca (CEIm: PI201903203).

#### **3.2. Obtención y extracción del ADN**

El análisis de polimorfismos HLA y KIR se realizó en muestras de ADN genómico aislado a partir de sangre periférica total, obtenida por venopunción, o exudados bucales procedentes tanto de los pacientes como de los controles sanos.

El aislamiento del ADN se llevó a cabo mediante la plataforma semiautomática MAXWELL®16 (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraídas las muestras, se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo para valorar la calidad del ADN extraído por espectrofotometría de luz UV, utilizando el NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific™, Inc, USA). Todas las muestras del estudio alcanzaron una concentración final de ADN entre 10-50 ng/μl con una medida de absorbancia a 260-280nm entre 1.65 y 2.0. Las muestras si no fueron utilizadas de inmediato, se almacenaron a una temperatura de -20 °C. La calidad y cantidad de ADN genómico purificado fue aceptable para realizar los ensayos de PCR según las instrucciones del fabricante.

#### **3.3. Genotipado de genes KIR con el kit LIFECODES® KIR-SSO en plataforma Luminex®**

El genotipado de los genes KIR se llevó a cabo utilizando el kit LIFECODES® KIR-SSO (Immucor GTI Diagnostics, Inc., USA) que utiliza la tecnología Luminex®. Esta metodología se basa en la hibridación de productos de amplificación obtenidos por PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO) marcados con fluorocromo se basa en productos de amplificación de PCR, ya que esta amplificación del ADN permite el enriquecimiento de las secuencias específicas diana que posteriormente se utilizan en la hibridación directa mediante sondas SSO (oligonucleótido de secuencia específica) para el genotipado KIR. Los resultados se analizaron con el Software MATCH IT! DNA (Immucor). El kit LIFECODES® KIR-SSO consta de dos mastermix (KIR-1 y KIR-2) para la amplificación independiente de los exones 2 y 3 de cada gen KIR, la mix de sondas KIR para la

hibridación post-PCR y una solución de dilución. La reacción de hibridación se revela con Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE).

Brevemente, la amplificación del ADN se realiza mediante PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparan dos reacciones de amplificación, una con cada mix (KIR-1 y KIR-2), utilizando 8µl de mastermix (KIR-1 o KIR-2) y 2µl de ADN (Volumen final/pocillo=10µl). Durante la amplificación se mantienen tapados los tubos de PCR para evitar la evaporación de la muestra. Se introducen las preparaciones en el termociclador y se aplican los ciclos detallados en la Tabla 1A. Tras la PCR, se procedió a la hibridación de los productos de amplificación utilizando las sondas SSO LIFECODES, tras su homogeneización mediante sonicación y posterior solubilización al baño durante 10 minutos a 55-60°C. A continuación, en una placa de PCR, se realizó la mezcla de hibridación añadiendo 7.5µl del mix de sondas con 2.5µl de producto de la amplificación de PCR y la placa se introdujo en el termociclador con los ciclos observados en la Tabla 1B.

**Tabla 1. A)** Ciclos aplicados en el termociclador durante la reacción de PCR para los genes KIR. **B)** Ciclos aplicados en el termociclador durante la reacción de hibridación de los productos de PCR con sondas SSO.

<b>A</b>				<b>B</b>		
<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación (minutos)</i>
<b>1</b>	95	2 minutos	1	<b>1</b>	97	2
<b>2</b>	94	30 segundos	40	<b>2</b>	47	10
	59	90 segundos		<b>3</b>	56	8
	72	30 segundos		<b>4</b>	56	∞
<b>3</b>	72	15 minutos	1			
<b>4</b>	4	∞	1			

Tras la hibridación se añade la solución de SA-PE y se analizaron las muestras en el citómetro Luminex® 200 IS. Los datos obtenidos en esta lectura se analizaron en el software LIFECODES MATCH IT!.

### 3.4. Tipaje en alta resolución de genes HLA mediante secuenciación masiva con el kit NGSgo® MX6-1 en plataforma Illumina® MiniSeq™

La secuenciación HLA de alta resolución mediante secuenciación masiva o NGS (del inglés “*next generation sequencing*”) representa uno de los avances más importantes para la caracterización de polimorfismos en genes HLA. En este estudio se ha utilizado el kit *multiplex* NGSgo® MX6-1 (GenDx, Netherlands) para el tipaje de alta resolución de los genes HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 y -DPB1 en plataforma MiniSeq™ Illumina®. El kit consta del vial de primers multiplex para la amplificación de los 6 genes HLA junto con la mastermix lista para usar GenDx-LongMix; el kit NGSgo®-LibrX con las enzimas necesarias para la preparación de la librería; el kit de adaptadores

para la reacción de indexación NGSgo-IndX Adapters & Indices Illumina Plate; los Kit Qubit™ dsDNA y KAPA SYBR® FAST qPCR para cuantificar las librerías y el cartucho de secuenciación de de Illumina® para MiniSeq™. Todos ellos almacenados a una temperatura de -20 °C, menos el kit Qubit™ dsDNA, que se almacena a temperatura ambiente. Los aparatos específicos utilizados en este proceso son el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), Qubit™ dsDNA BR Assay (Invitrogen) y secuenciador Miniseq™ de Illumina®.

En primer lugar, se realiza la amplificación del ADN genómico mediante el kit NGSgo® MX6-1, ajustando la concentración a 40ng/μl. Se prepara la mastermix para la PCR siguiendo las instrucciones del fabricante en función del número de muestras. Los volúmenes necesarios para la reacción de PCR son 12μl de la mastermix + 3μl de ADN (120ng ADN/muestra). Se introducen las muestras en el termociclador para la reacción de amplificación por PCR que presente en Tabla 2A.

Tras la reacción de PCR hay que cuantificar los amplicones para poder utilizar 250ng de cada muestra necesarios para construir la librería. Este paso se realiza mediante el uso de fluorocromos que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN en una reacción de fluorometría con el kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific™, Inc, USA). En función de la concentración de cada amplicón se transfiere el volumen necesario, conteniendo 250ng del mismo, para los pasos iniciales en la construcción de la librería.

La preparación de la librería de ADN necesaria para la secuenciación consta de 3 etapas: 1) fragmentación, 2) ligación y 3) indexación. En primer lugar, la fragmentación del ADN, necesaria para asegurar una cobertura completa del gen mediante la generación de múltiples fragmentos cortos (400pb aproximadamente). Durante este proceso es importante trabajar en frío para la conservación. En la reacción de fragmentación se utiliza el kit NGSgo®-LibrX que contiene la enzima fragmentasa, con actividad endonucleasa, y la enzima reparadora de los extremos finales (del inglés “*end repair*”) y sus respectivos tampones, además del volumen de ADN necesario en función de la concentración de cada muestra medida con Qubit™, obteniendo un volumen final de 32.5μl. Se sella la placa, se homogeneizan las muestras y se les aplican los ciclos en el termociclador especificados en Tabla 2B. Tras esta fragmentación, el ADN presenta colas de poli-A que servirán de sitio de unión a los adaptadores que se unen durante la reacción de ligación. Estos adaptadores son fragmentos de ADN que sirven de molde en la secuenciación, y en el caso del kit NGSgo®-LibrX tienen colas de poli-T.

Durante el siguiente paso, la ligación, se prepara la mastermix que contiene 8μl de la enzima ligasa, 0.25μl de adaptadores específicos de Illumina (AD-IL) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 9.25μl en total. Cuando la reacción de fragmentación llega a los 15°C en el termociclador hay que ponerla inmediatamente en hielo y a continuación se añaden 9.25μl de mastermix de ligación a cada pocillo de esta Master Mix en su totalidad a la placa y se retorna al

termociclador donde se le aplican los ciclos indicados en Tabla 2C. Al finalizar la ligación se realiza la purificación de las muestras, retirando los excesos de enzimas y nucleótidos no incorporados que pueden interferir en la preparación de la librería, mediante la selección de fragmentos de ADN por tamaño utilizando bolas magnéticas con el kit AMPure XP mediante varios ciclos de lavados donde el ADN se “pega” a las bolas magnéticas que quedan inmovilizadas utilizando un imán (SPRI, del inglés “*Solid Phase Reversible Immobilisation*”), retirando con los lavados los fragmentos largos, por lo que podemos seleccionar los fragmentos de ADN de tamaños pequeños (<400pb).

Tras la purificación viene la indexación, que es una reacción de PCR anidada en donde los fragmentos de ADN + adaptadores deben ser marcados mediante diferentes combinaciones de índices, que son secuencias de nucleótidos, necesarios para distinguir cada muestra de ADN al realizar la secuenciación y la lectura por Miniseq™ de Illumina. Para ello se transfieren 14µl del buffer HiFi PCR Mix del kit NGSgo-LibrX a cada pocillo de índice que se vaya a utilizar en la placa NGSgo-IndX, que contiene los índices, y se homogeneiza con la punta de la pipeta. A continuación, se transfiere 12.5µl de índices resuspendidos a los pocillos correspondientes de la placa que contiene las muestras de ADN. Se mezcla el contenido, se sella la placa y se introduce en el termociclador aplicando los ciclos indicados en la Tabla 2D.

Una vez culminada la reacción de indexación, se procede a la creación de la librería de ADN transfiriendo 2.5µl de cada muestra en un tubo de 1.5ml obteniendo un volumen final de 100µl en el caso de secuenciar 48 muestras. A continuación, se purifica de nuevo la librería de ADN mediante un procedimiento similar al realizado tras la fragmentación. Tras esta purificación y la retirada de residuos tenemos una librería o *pool* de 60µl que contiene los fragmentos de ADN de 400pb, obtenidos de la amplificación de los genes HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 y -DPB1, con adaptadores AD-IL e índices listos para ser secuenciados.

Antes de secuenciar la librería hay que diluirla a una concentración final de 1.5pM; para ello se cuantifica la librería mediante una reacción de PCR cuantitativa utilizando el kit qPCR KAPA Biosystems (Roche Diagnostics Ltd, USA). Se realizan diluciones seriadas de la librería de ADN que se combinan con una mastermix, cuyos componentes son KAPA SYBR® FAST y agua; añadiéndose 4µl de dilución de librería o estándares de la curva patrón+ 16µl de mastermix a la placa de qPCR. Las preparaciones se leen con StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific™, Inc, USA) obteniéndose la concentración de la librería de ADN, a partir de la cual se diluye hasta la concentración de 1.5pM.

Previa a la dilución hay que desnaturalizar la librería de ADN con NaOH 0.1 M, que permite obtener ADN de hebra única necesario para el funcionamiento de la secuenciación. Tras la desnaturalización y dilución final de la librería, se cargan 500µl de la misma en el cartucho MiniSeq™

300 cycles v2, y éste se introduce en el secuenciador Miniseq™ de Illumina® junto con la “flow cell” permitiendo obtener una densidad de cluster entre 160-220 K/mm<sup>2</sup> con una profundidad media de 1500 lecturas por gen HLA. Con ello empieza la secuenciación basada en una reacción de amplificación en puente (del inglés, “*bridge amplification*”) sobre la superficie de la “flow cell” cubierta con *primers* que permiten la unión de los fragmentos de ADN. Los resultados obtenidos tras 16 horas de secuenciación aproximadamente se validan y analizan mediante el software NGSengine (GenDX, Netherlands).

**Tabla 2.** Ciclos aplicados en el termociclador durante la reacción de cadena de **A)** Amplificación, donde tenemos etapas de desnaturalización, alineamiento y elongación; **B)** Fragmentación, con etapas de fragmentación y reparación de extremos y dA-tailing; **C)** Ligación de adaptadores y **D)** Indexación, con mismas etapas que amplificación.

A				B		
<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación (minutos)</i>
1	95	3 minutos	1	1	25	20
2	95	15 segundos	25	2	70	10
	65	30 segundos		3	15	∞
	68	5 minutos				
3	68	10 minutos	1			
4	15	∞	-			

C			D			
<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	<i>Número de ciclos</i>
1	20	15 minutos	1	98	30 segundos	1
2	15	∞	2	98	10 segundos	10
				65	30 segundos	
				72	30 segundos	
			3	72	5 minutos	1
			4	15	∞	-

### 3.5. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos demográficos, clínicos y genéticos de pacientes con LMA y del grupo control se introdujeron en una base unificada de datos Excel (Microsoft Office®, ©Microsoft Inc, USA). Las variables cualitativas están representadas como la media ± el error estándar de la media (SEM), mientras que las variables categóricas están representadas como frecuencias absolutas y relativas.

El análisis de la diversidad genética, frecuencias genotípicas y haplotípicas HLA, y del equilibrio de Hardy-Weinberg en los dos grupos de estudio (pacientes con LMA y control) se realizó con el software Arlequin 3.5 (Berna, Suiza). Concretamente, las frecuencias genotípicas para cada locus HLA y las frecuencias haplotípicas más probables (del inglés “*maximum-likelihood*”) fueron estimadas a partir de los datos multi-locus observados en ambos grupos de estudio utilizando el algoritmo de “*expectation-maximization*” (EM) utilizando 1000 iteraciones en el proceso de modelización. Las desviaciones estándar de las frecuencias genotípicas y haplotípicas se obtuvieron con una aproximación de 1000 *bootstraps*. Las desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg se

calcularon mediante el test exacto de tablas de contingencia 2x2 (test modificado de Markov) para cada locus HLA utilizando 100,000 pasos de dememorización para las comparaciones de las probabilidades de heterocigosidad observada y esperada.

Las frecuencias fenotípicas de los genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1; y de los genes KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; así como el estudio de las variables cuantitativas y cualitativas recogidas en el estudio (ej. presencia/ausencia para determinado gen HLA y/o KIR, sexo, edad, clasificación de LMA, etc...) en pacientes LMA y grupo control se obtuvieron con el software IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corp. Armonk, NY).

El objetivo principal del análisis estadístico fue el estudio de supervivencia global en pacientes con LMA calculada como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte del paciente por cualquier causa. El seguimiento de los pacientes se llevó a cabo mediante el registro de la última visita o toma de contacto con del paciente siendo el más reciente de ellos en junio de 2021. Para ello las variables cuantitativas nominales o categóricas se analizaron mediante el uso de tablas de contingencia utilizando la prueba de chi-cuadrado o test exacto de Fisher, según aplique, con corrección de Bonferroni; mientras que el análisis de variables cuantitativas se realizó mediante la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney o paramétrica T de Student, según aplique, tras comprobar si los datos del estudio seguían una distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov. Las asociaciones estadísticamente significativas por la prueba chi-cuadrado o test exacto de Fisher fueron estimadas como OR (del inglés “*odd ratio*”) con el intervalo de confianza al 95%

Aquellos alelos HLA y genes KIR que fueron significativos o cercanos a la significación en el estudio univariado, junto con variables importantes por presentar alto valor clínico, fueron estudiados en un análisis multivariado mediante regresión Cox obteniendo el RR (del inglés “*relative risk*”) y el intervalo de confianza al 95%. La probabilidad de supervivencia fue calculada utilizando el test de Kaplan-Meier y el estadístico de Log-Rank se utilizó para calcular la asociación entre las variables. El nivel de significación se fijó en un valor de  $P < 0.05$ . La corrección de Bonferroni ( $P_c$ ) se aplicó cuando fue necesaria.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes

El presente Trabajo de Fin de Grado surge de un estudio retrospectivo en donde se incluyeron un total de 312 pacientes diagnosticados de LMA entre los años 2010 y 2020 en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, todos ellos trasplantados de progenitores hematopoyéticos. La media de edad de la población de pacientes diagnosticados de LMA en este estudio fue de 54 (1-86), encontrando que los pacientes que fallecieron presentaron una mediana de edad significativamente superior a los pacientes que permanecieron vivos [57 (12-86) vs 53 (1-71),  $P=0.036$ ]. El seguimiento medio de los pacientes en este estudio fue de 20 meses (rango, 0-163) con un 87.8% ( $n=274$ ) menores de 65 años, mientras que el 12.2% ( $n=38$ ) restante superaba dicha edad. Del total de pacientes incluidos en el estudio, el 53% ( $n=166$ ) eran hombres y el 47% ( $n=147$ ) mujeres (Tabla 3). El tipo de LMA más frecuente en esta serie de pacientes fue la LMA con cambios relacionados a mieloplasia (23.2%,  $n=41$ ) siguiendo la clasificación de OMS y el subtipo M2 (21%,  $n=22$ ) por la clasificación de la FAB. En nuestra serie de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre el sexo y mortalidad.

**Tabla 3.** Características demográficas y clínicas de la población a estudio de pacientes diagnosticados de LMA.

	Total (N=312)	LMA Exitus (n=95)	LMA No Exitus (n=198)	P
<b>Edad, años</b>				
Mediana (rango)	54 (1-86)	57 (12-86)	53 (1-71)	0.036*
<65 años, n (%)	274 (87.8%)	79 (83.2%)	180 (90.9%)	0.052
>65 años, n (%)	38 (12.2%)	16 (16.8%)	18 (9.1%)	
<b>Seguimiento, mediana (rango), meses</b>	20 (0-163)	11 (0-89)	26 (0-163)	<0.0001*
<b>Sexo, n (%)</b>				
Masculino	166 (53%)	50 (53%)	107 (54%)	0.821
Femenino	146 (47%)	45 (47%)	91 (46%)	

Abreviaturas: **LMA**, Leucemia Mieloblástica Aguda; **P**, p-valor; **OMS**, Organización Mundial de la Salud; **FAB**, Clasificación Franco-Americana-Británica; **NOS**, no especificada de otro modo.

\*comparaciones obtenidas mediante la prueba paramétrica T Student.  $P$  significativo <0.05 para la comparación de medias asumiendo igualdad de varianzas.

### 4.2. Estudio de polimorfismos HLA de clase I y clase II

#### 4.2.1. Frecuencias alélicas, fenotípicas y haplotípicas de HLA

Tras el análisis de diversidad genética en la cohorte de pacientes con LMA, se obtuvieron un total de 524 copias génicas, agrupadas en 160 grupos alélicos distribuidos en 5 loci HLA diferentes (30 para HLA-A, 50 para HLA-B, 29 para HLA-C, 34 para HLA-DRB1 y 17 para HLA-DQB1). La heterocigosidad esperada para HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1 fue 88.36%, 95.43%, 92.47%, 92.84% y 89.13% respectivamente, concordante con aquellas observadas tanto en la península Ibérica



como en otras poblaciones europeas<sup>(34)</sup>. No se observan desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg en los loci HLA analizados ( $P > 0.05$ ).

Como se muestra en la tabla 4, los alelos más frecuentes para cada gen HLA en nuestra cohorte de LMA fueron el HLA-A\*02:01 (28.05%), HLA-B\*44:03 (10.88%), HLA-C\*04:01 (13.74%), HLA-DRB1\*07:01 (17.56%) y HLA-DQB1\*03:01 (17.75%). Igualmente, en el grupo de estudio de LMA se identificaron un total de 476 haplotipos, de los cuales los seis haplotipos con una frecuencia superior al 1% fueron: A\*29:02~B\*44:03~C\*16:01~DRB1\*07:01~DQB1\*02:02 (2.67%), A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01 (2.29%), A\*03:01~B\*07:02~C\*07:02~DRB1\*15:01~DQB1\*06:02 (2.09%), A\*02:01~B\*44:03~C\*16:01~DRB1\*07:01~DQB1\*02:02 (1.71%), A\*33:01~B\*14:02~C\*08:02~DRB1\*01:02~DQB1\*05:01 (1.33%) y A\*02:01~B\*18:01~C\*05:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01 (1.145%).

En cuanto al grupo control formado por donantes voluntarios de REDMO, se han obtenido un total de 2286 copias génicas, agrupadas en 231 grupos alélicos en 5 loci HLA diferentes (42 para HLA-A, 83 para HLA-B, 39 para HLA-C, 49 para HLA-DRB1 y 18 para HLA-DQB1). No se observaron desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg para los 6 loci HLA analizados ( $p > 0.05$ ). Las frecuencias alélicas obtenidas para este grupo se muestran en Tabla 4, siendo los alelos *HLA-A\*02:01* (25.77%), *HLA-B\*44:03* (9.42%), *HLA-C\*04:01* (15.41%), *HLA-DRB1\*07:01* (16.29%) y *HLA-DQB1\*03:01* (16.08%) los más frecuentes dentro de cada loci. Del mismo modo, se identificaron un total de 1962 haplotipos, de los cuales únicamente un haplotipo presentó una frecuencia mayor de 1%: A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01 (1.39%).



**Tabla 4.** Distribución de frecuencias alélicas (%) de HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 en pacientes diagnosticados de LMA (n=312) y en controles sanos (n=1164).

<i>HLA-A</i>	<i>Pacientes LMA</i>	<i>Controles</i>	<i>HLA-B</i>	<i>Pacientes LMA</i>	<i>Controles</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>Pacientes LMA</i>	<i>Controles</i>
<i>A*02:01</i>	28,0534	25,7739	<i>B*44:03</i>	10,8779	9,4213	<i>DRB1*07:01</i>	17,5573	16,2853
<i>A*24:02</i>	8,9695	8,7483	<i>B*51:01</i>	7,6336	8,8829	<i>DRB1*03:01</i>	10,1145	9,825
<i>A*03:01</i>	8,3969	9,7577	<i>B*18:01</i>	6,6794	6,9987	<i>DRB1*13:01</i>	8,5878	7,3351
<i>A*01:01</i>	8,0153	9,6904	<i>B*07:02</i>	6,4885	8,1427	<i>DRB1*15:01</i>	8,3969	10,498
<i>A*11:01</i>	7,0611	7,6043	<i>B*44:02</i>	6,1069	6,4603	<i>DRB1*11:01</i>	6,4885	5,3163
<i>A*29:02</i>	6,8702	6,9987	<i>B*08:01</i>	5,7252	5,9219	<i>DRB1*01:01</i>	5,3435	6,7968
<i>A*26:01</i>	4,1985	4,105	<i>B*14:02</i>	4,9618	3,5666	<i>DRB1*01:02</i>	4,3893	0,3571
<i>A*30:02</i>	4,0076	3,3647	<i>B*35:01</i>	4,3893	5,6528	<i>DRB1*13:02</i>	4,1985	4,7106
<i>A*23:01</i>	3,2443	3,6339	<i>B*15:01</i>	4,1985	3,0283	<i>DRB1*11:04</i>	4,0076	4,105
<i>A*68:01</i>	2,6718	2,1534	<i>B*49:01</i>	4,0076	4,3742	<i>DRB1*04:05</i>	3,0534	2,0188
<i>A*32:01</i>	2,4809	2,961	<i>B*35:03</i>	2,6718	2,2207	<i>DRB1*04:02</i>	2,4809	1,9515
<i>A*02:05</i>	2,0992	1,9515	<i>B*38:01</i>	2,6718	2,3553	<i>DRB1*04:01</i>	2,0992	0,3401
<i>A*33:01</i>	2,0992	1,9515	<i>B*13:02</i>	2,4809	1,2113	<i>DRB1*04:03</i>	2,0992	0,3087
<i>A*68:02</i>	2,0992	1,3459	<i>B*50:01</i>	2,4809	2,4226	<i>DRB1*04:04</i>	2,0992	0,4057
<i>A*25:01</i>	1,7176	2,0188	<i>B*52:01</i>	2,2901	1,4805	<i>DRB1*10:01</i>	2,0992	2,1534
<i>A*31:01</i>	1,7176	1,5478	<i>B*53:01</i>	2,0992	1,0767	<i>DRB1*13:03</i>	1,9084	2,1534
<i>A*30:01</i>	1,5267	1,144	<i>B*27:05</i>	1,9084	0,0000	<i>DRB1*08:01</i>	1,7176	1,9515
<i>A*66:01</i>	0,9542	0,6729	<i>B*40:01</i>	1,9084	1,9515	<i>DRB1*15:02</i>	1,7176	0,8748
<i>A*03:02</i>	0,5725	0,7402	<i>B*55:01</i>	1,9084	1,5478	<i>DRB1*01:03</i>	1,5267	1,2786
<i>A*01:02</i>	0,3817	0,3365	<i>B*57:01</i>	1,9084	2,6245	<i>DRB1*11:02</i>	1,5267	1,4132
<i>A*02:20</i>	0,3817	0,1346	<i>B*58:01</i>	1,5267	0,9421	<i>DRB1*12:01</i>	1,5267	0,6729
<i>A*30:04</i>	0,3817	0,3365	<i>B*37:01</i>	1,3359	1,0094	<i>DRB1*14:54</i>	1,3359	1,817
<i>A*33:03</i>	0,3817	0,3365	<i>B*41:01</i>	1,3359	0,6057	<i>DRB1*04:06</i>	1,145	0,6729
<i>A*69:01</i>	0,3817	0,4038	<i>B*14:01</i>	1,145	1,817	<i>DRB1*14:01</i>	0,9542	0,0442
<i>A*80:01</i>	0,3817	0,2019	<i>B*35:02</i>	0,9542	1,5478	<i>DRB1*16:01</i>	0,9542	0,2537
<i>A*24:26</i>	0,1908	0,0000	<i>B*45:01</i>	0,9542	1,4132	<i>DRB1*04:07</i>	0,5725	0,1547
<i>A*29:01</i>	0,1908	0,2019	<i>B*50:02</i>	0,9542	0,5384	<i>DRB1*09:01</i>	0,5725	0,8311
<i>A*33:05</i>	0,1908	0,1346	<i>B*15:03</i>	0,7634	0,2692	<i>DRB1*13:05</i>	0,3817	0,6999
<i>A*34:02</i>	0,1908	0,2019	<i>B*35:08</i>	0,7634	0,8748	<i>DRB1*04:08</i>	0,1908	0,3937
<i>A*36:01</i>	0,1908	0,00437	<i>B*15:17</i>	0,5725	0,7402	<i>DRB1*08:03</i>	0,1908	0,1750
<b><i>HLA-C</i></b>			<i>B*39:01</i>	0,5725	0,8075	<i>DRB1*08:04</i>	0,1908	0,3062
<i>C*04:01</i>	13,7405	15,4105	<i>B*41:02</i>	0,5725	0,3365	<i>DRB1*08:06</i>	0,1908	0,3062
<i>C*07:01</i>	12,2137	13,6608	<i>B*56:01</i>	0,5725	0,5384	<i>DRB1*11:03</i>	0,1908	0,3937
<i>C*06:02</i>	9,1603	7,2005	<i>B*73:01</i>	0,5725	0,0000	<i>DRB1*16:02</i>	0,1908	0,2187
<i>C*16:01</i>	8,7786	7,2005	<i>B*07:05</i>	0,3817	0,0875	<b><i>HLA-DQB1</i></b>		
<i>C*05:01</i>	8,5878	9,8923	<i>B*15:18</i>	0,3817	0,2187	<i>DQB1*03:01</i>	17,7481	16,0834
<i>C*07:02</i>	7,4427	9,1521	<i>B*27:02</i>	0,3817	0,2187	<i>DQB1*02:02</i>	15,458	14,1319
<i>C*08:02</i>	6,2977	5,0471	<i>B*39:06</i>	0,3817	0,3062	<i>DQB1*05:01</i>	13,5496	13,1225
<i>C*12:03</i>	6,1069	5,6528	<i>B*40:02</i>	0,3817	1,4436	<i>DQB1*02:01</i>	10,3053	10,1615
<i>C*03:03</i>	4,5802	3,8358	<i>B*07:14</i>	0,1908	0,0000	<i>DQB1*03:02</i>	8,9695	10,6999
<i>C*01:02</i>	3,0534	3,432	<i>B*15:10</i>	0,1908	0,1312	<i>DQB1*06:03</i>	8,7786	7,8735
<i>C*02:02</i>	3,0534	4,5087	<i>B*18:04</i>	0,1908	0,0437	<i>DQB1*06:02</i>	7,6336	10,498
<i>C*15:02</i>	2,6718	3,2301	<i>B*18:05</i>	0,1908	0,0000	<i>DQB1*03:03</i>	3,626	2,6918
<i>C*03:04</i>	2,2901	2,6918	<i>B*27:07</i>	0,1908	0,0000	<i>DQB1*04:02</i>	3,4351	3,432
<i>C*12:02</i>	2,0992	0,9421	<i>B*35:43</i>	0,1908	0,0875	<i>DQB1*06:04</i>	2,8626	3,2974
<i>C*14:02</i>	1,5267	2,1534	<i>B*41:43</i>	0,1908	0,0000	<i>DQB1*05:03</i>	2,2901	1,7497
<i>C*17:01</i>	1,3359	0,4711	<i>B*44:27</i>	0,1908	0,1312	<i>DQB1*06:01</i>	1,7176	0,7402
<i>C*15:05</i>	1,145	0,6057	<i>B*51:07</i>	0,1908	0,0875	<i>DQB1*05:02</i>	1,145	2,5572
<i>C*07:04</i>	0,9542	0,6057	<i>B*51:08</i>	0,1908	0,3500	<i>DQB1*06:09</i>	1,145	1,2786
<i>C*07:18</i>	0,9542	0,6729	<i>B*51:75</i>	0,1908	0,0875	<i>DQB1*03:19</i>	0,9542	1,144
<i>C*02:10</i>	0,7634	0,2019				<i>DQB1*03:04</i>	0,1908	0,3365
<i>C*16:02</i>	0,7634	1,144				<i>DQB1*06:13</i>	0,1908	0,000
<i>C*05:09</i>	0,5725	0,3365						
<i>C*17:03</i>	0,5725	0,3365						
<i>C*03:02</i>	0,3817	0,3365						
<i>C*03:07</i>	0,1908	0,01312						
<i>C*08:01</i>	0,1908	0,0000						
<i>C*12:12</i>	0,1908	0,00437						
<i>C*15:04</i>	0,1908	0,1346						
<i>C*16:04</i>	0,1908	0,1346						

Abreviaturas: **HLA**, *Human Leukocyte Antigen*; **LMA**, *Leucemia Mieloblástica Aguda*.

#### 4.2.2. Asociación de las variaciones genéticas HLA con el desarrollo de LMA

Las frecuencias fenotípicas entre pacientes LMA y el grupo control se muestran en la Tabla 5. Las frecuencias fenotípicas de los genes *HLA-C\*12:02* (5.2% vs 1.8%,  $P=0.001$ ,  $P_c=0.016$ ,  $OR=2.962$ , 95%  $IC=1.826-5.747$ ), *HLA-DRB1\*14:01* (2.3% vs 0.3%,  $P<0.001$ ,  $P_c=0.002$ ,  $OR=8.873$ , 95%  $IC=2.281-34.515$ ) y *HLA-DQB1\*06:01* (4.4% vs 1.8%,  $P=0.009$ ,  $P_c=0.045$ ,  $OR=2.56$ , 95%  $IC=1.236-5.3030$ ) fueron significativamente mayor en pacientes LMA comparado con el grupo control. Estas diferencias se mantuvieron estadísticamente significativas tras el ajuste multivariante. El resto de los genes HLA presentes en la Tabla 5 mostraron una ligera diferencia en la frecuencia fenotípica entre pacientes LMA y controles, sin embargo, la significación estadística se perdió tras la corrección de Bonferroni.

**Tabla 5.** Frecuencias fenotípicas de genes HLA en el grupo control y de pacientes LMA.

Genes HLA, n (%)	Controles (N=1164)	Pacientes LMA (N=312)	P	P <sub>c</sub>	OR (95% IC)
<i>B*13:02</i>	27 (2.3%)	14 (4.5%)	0.038	1.102	1.985 (1.028-3.833)
<i>B*15:03</i>	4 (0.3%)	5 (1.6%)	0.024	0.696	4.739 (1.265-17.753)
<i>B*40:02</i>	34 (2.9%)	3 (1%)	0.050	1.45	0.324 (0.099-1.061)
<i>B*52:01</i>	29 (2.5%)	16 (5.1%)	<b>0.016*</b>	0.464	2.123 (1.138-3.961)
<i>B*53:01</i>	23 (2%)	13 (4.2%)	0.025	0.725	2.164 (1.083-4.323)
<i>B*73:01</i>	1 (0.1%)	3 (1%)	0.031	0.899	11.328 (1.174-109.281)
<i>C*02:10</i>	3 (0.5%)	5 (1.6%)	0.013	0.208	6.343 (1.508-26.690)
<i>C*12:02</i>	21 (1.8%)	16 (5.2%)	<b>0.001*</b>	<b>0.016</b>	<b>2.962 (1.826-5.747)</b>
<i>C*16:01</i>	155 (13.4%)	57 (18.4%)	0.024	0.384	1.467 (1.051-2.047)
<i>C*17:01</i>	11 (0.9%)	8 (2.6%)	0.041	0.656	2.776 (1.107-6.963)
<i>DRB1*14:01</i>	3 (0.3%)	7 (2.3%)	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>8.873 (2.281-34.515)</b>
<i>DRB1*15:02</i>	24 (2.1%)	14 (4.5%)	0.016*	0.208	2.229 (1.159-4.363)
<i>DQB1*05:02</i>	59 (5.2%)	7 (2.6%)	0.064	0.32	0.479 (0.216-1.061)
<i>DQB1*06:01</i>	20 (1.8%)	12 (4.4%)	<b>0.009*</b>	<b>0.045</b>	<b>2.560 (1.236-5.303)</b>

Abreviaturas: **HLA**, Human Leukocyte Antigen; **LMA**, Leucemia Mieloblástica Aguda; **P**, p-valor univariante; **P<sub>c</sub>**, p-valor con corrección de Bonferroni; **OR**, Odd Ratio; **95% IC**, Intervalo de confianza de 95%; N, número total de controles y de pacientes incluidos en el estudio.

\*Estos alelos forman parte del haplotipo *A\*02:01~B\*52:01~C\*12:02~DRB1\*15:02~DQB1\*06:01* que se encuentra más representado en pacientes LMA (0.9542%) comparado con el grupo control.

#### 4.2.3. Estudio de las variaciones genéticas HLA y supervivencia global en pacientes con LMA

La mediana de seguimiento en nuestro estudio fue de 20 meses (rango, 1-163 meses), con una supervivencia global (SG) a los 5 y 10 años del 56.1% y 49.2%, respectivamente en nuestra serie de pacientes con LMA.

Las frecuencias fenotípicas, la edad y el sexo entre pacientes LMA exitus y no exitus se muestran en la Tabla 6. El análisis del riesgo de mortalidad asociado a la presencia de un determinado alelo HLA reveló que pacientes LMA del grupo exitus presentaron una frecuencia fenotípica para los genes *HLA-B\*53:01* (9.5% vs 2.0%,  $P_1=0.001$ ,  $P_2=0.0003$ ,  $RR=3.695$ , 95%  $IC=1.813-7.529$ ) y

*HLA-DRB1\*11:01* (15.8% vs 8.2%,  $P_1=0.031$ ,  $P_2=0.031$ ,  $RR=1.855$ , 95%  $IC=1.058-3.253$ ) estadísticamente significativa superior que en el grupo de no exitus. Adicionalmente, el alelo *HLA-C\*03:03* mostró una asociación débil con un mayor riesgo de mortalidad en pacientes LMA únicamente tras el ajuste multivariado; sin embargo, esta asociación no presentó ventaja alguna en la supervivencia global de los pacientes LMA (datos no mostrados). Finalmente, los pacientes LMA del grupo exitus en nuestra serie presentó una edad media significativamente mayor en comparación con el grupo de pacientes LMA no exitus ( $53.1 \pm 1.5$  vs  $49.9 \pm 1.5$ ,  $P_1=0.028$ ,  $P_2=0.028$ ,  $RR=1.021$  (1.002-1.040)). No se observaron diferencias significativas en el sexo de los pacientes LMA exitus y no exitus.

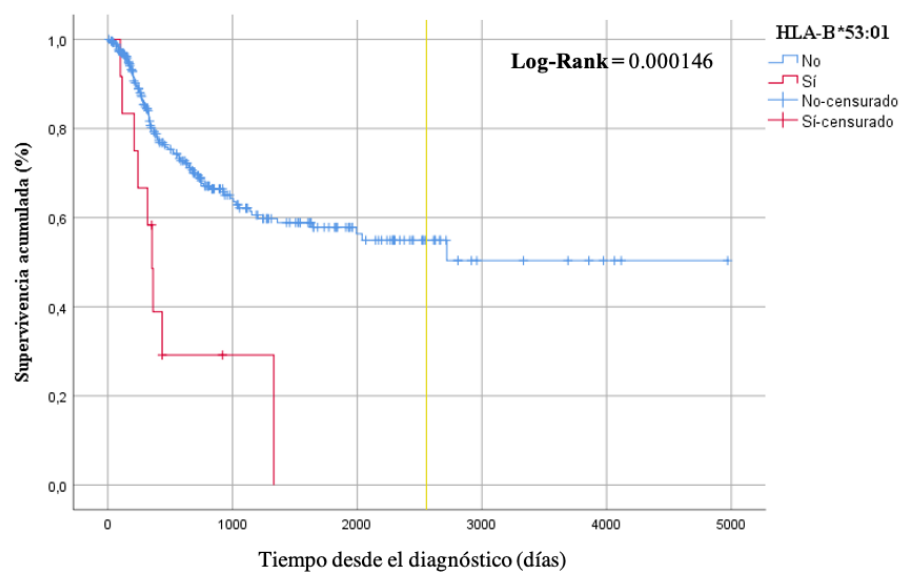
**Tabla 6.** Frecuencias fenotípicas HLA y datos demográficos en pacientes LMA exitus y no exitus.

<b>Genes HLA, n (%)</b>	<b>LMA Exitus (n=95)</b>	<b>LMA No Exitus (n=198)</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>RR (95% IC)</b>
<b><i>B*53:01</i></b>	9 (9.5%)	3 (2.0%)	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>3.695 (1.813-7.529)</b>
<b><i>C*03:03</i></b>	13 (14.3%)	14 (7.0%)	0.073	0.045	1.835 (1.013-3.322)
<b><i>DRB1*11:01</i></b>	15 (15.8%)	16 (8.2%)	<b>0.031</b>	<b>0.031</b>	<b>1.855 (1.058-3.253)</b>
<b>Datos demográficos</b>					
Edad, años, mediana (rango)	57 (12-86)	53 (1-71)	<b>0.025</b>	<b>0.028</b>	<b>1.021 (1.002-1.040)</b>
Sexo, n (%)					
Masculino	50 (53%)	107 (54%)	0.973	0.973	0.993 (0.652-1.510)
Femenino	43 (47%)	91 (46%)			

Abreviaturas: **HLA**, *Human Leukocyte Antigen*; **LMA**, Leucemia Mieloblástica Aguda; **P1**, análisis univariante; **P2**, análisis multivariante; **RR**, riesgo relativo; **95% IC**, Intervalo de confianza de 95%; n, número de pacientes en cada subgrupo.

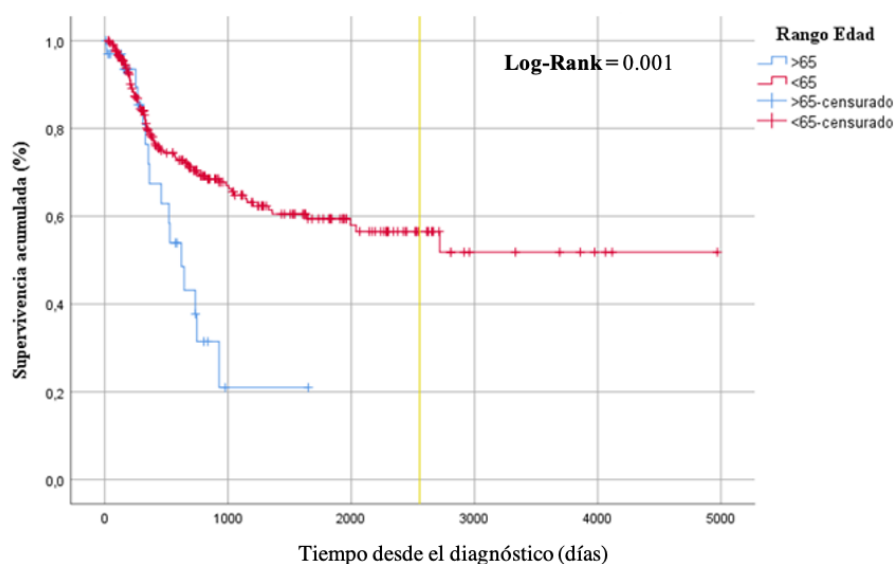
En relación con los diferentes polimorfismos HLA, la supervivencia global de los pacientes LMA positivos para el alelo *HLA-B\*53:01* (Figura 5) fue del 31.3% a los 36 meses del diagnóstico, en comparación con el 62.4% del grupo *HLA-B\*53:01* negativo (Figura 5, Log-Rank=0.000146). Las diferencias en la SG a los 5 años observada para los alelos *HLA-C\*03:03* (54.5% vs 56.3%, Log-rank=0.108) y *HLA-DRB1\*11:01* (37.3% vs 58.3%, Log-Rank=0.054) no fueron estadísticamente significativas, si bien la supervivencia acumulada en pacientes *HLA-DRB1\*11:01* positivos fue sustancialmente inferior casi llegando a alcanzar la significación estadística. Este dato nos hace sospechar que la mortalidad en este grupo pueda estar afectada por otras variables, las cuales deberán tenerse en cuenta en futuros análisis.

La SG observada en nuestra serie de pacientes atendiendo al rango de edad también mostró diferencias estadísticamente significativas. En concreto, el grupo de pacientes <65 años presentó una tasa de supervivencia a los 36 meses desde el diagnóstico del 65% vs 21.6% del grupo >65 años (Figura 6, Log-Rank=0.001). Un dato relevante fue que la supervivencia acumulada a los 12 meses fue independiente de la edad de los pacientes.



SG	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
<i>HLA-B*53:01</i> Neg (n=279)	78.6% (n=167)	68.6% (n=121)	62.4% (n=83)	59.2% (n=66)	58.1% (n=47)
<i>HLA-B*53:01</i> Pos (n=12)	41.7% (n=4)	31.3% (n=3)	31.3% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)

**Figura 5.** Supervivencia global en la serie completa de pacientes LMA en función de la presencia/ausencia del alelo *HLA-B\*53:01*. Log-Rank=0.000146. En amarillo: punto de corte en la mitad del seguimiento (81.5 meses).



SG	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
<65 años (n=155)	77.8% (n=155)	70.7% (n=116)	65% (n=84)	60.8% (n=65)	59.7% (n=48)
>65 años (n=15)	67.5% (n=15)	54% (n=10)	21.6% (n=1)	21.6% (n=1)	0% (n=0)

**Figura 6.** Supervivencia global en la serie completa de pacientes LMA en función del grupo de edad. Log-Rank=0.001. En amarillo: punto de corte en la mitad del seguimiento (81.5 meses).

### 4.3. Estudio de polimorfismos KIR

Del mismo modo que con el sistema polimórfico HLA, se han estudiado las frecuencias fenotípicas de los genes KIR en la serie de pacientes LMA y grupo control incluidos en este estudio para buscar si existen correlaciones entre la expresión de un determinado gen KIR asociado al desarrollo de LMA y a mortalidad.

#### 4.3.1. Asociación de los polimorfismos KIR con en el desarrollo de LMA

Se analizaron 16 genes KIR diferentes en 217 pacientes LMA y en 262 donantes voluntarios sanos del grupo control calculándose las frecuencias fenotípicas para cada uno de los genes en ambos grupos de estudio. Las frecuencias fenotípicas observadas para el grupo de genes KIR inhibidores *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5* y *KIR3DL2* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes LMA y grupo control (Tabla 7). Sin embargo, cabe destacar que la frecuencia del gen inhibidor *KIR3DL1* fue menor en el grupo de pacientes comparado con controles, rozando la significación estadística (96.6% vs 92.6%,  $P=0.056$ ).

Por el contrario, el único gen activador que mostró diferencias estadísticamente significativas fue el gen *KIR2DS4*, el cual presentó una frecuencia fenotípica superior en controles en comparación con pacientes LMA (Tabla 7; 97.3% vs 92.2%,  $P=0.01$ , OR=0.323, 95% IC=0.131-0.794).

**Tabla 7.** Frecuencias fenotípicas de genes KIR en grupo control y pacientes diagnosticados de LMA. Significancia estadística y riesgo (OR) de genes KIR en el desarrollo de LMA.

Genes KIR, n (%)	Controles (n=262)	Pacientes LMA (n=217)	P	OR (95% IC)
<i>KIR2DL1</i>	253 (96.6%)	211 (97.2%)	0.675	1.251 (0.438-3.571)
<i>KIR2DL2</i>	141 (53.8%)	132 (60.8%)	0.123	1.333 (0.925-1.920)
<i>KIR2DL3</i>	238 (90.8%)	192 (88.5%)	0.396	0.774 (0.429-1.399)
<i>KIR2DL4</i>	260 (99.2%)	216 (99.5%)	0.676	1.662 (0.150-18.448)
<i>KIR2DL5</i>	134 (51.1%)	127 (58.5%)	0.106	1.348 (0.938-1.937)
<i>KIR3DL1</i>	253 (96.6%)	201 (92.6%)	0.056	0.447 (0.193-1.032)
<i>KIR3DL2</i>	261 (99.6%)	216 (99.5%)	0.894	0.828 (0.051-13.309)
<i>KIR3DL3</i>	262 (100%)	217 (100%)	---	---
<i>KIR3DS1</i>	93 (35.5%)	84 (38.7%)	0.468	1.148 (0.791-1.666)
<i>KIR2DS1</i>	94 (35.9%)	88 (40.6%)	0.294	1.219 (0.842-1.766)
<i>KIR2DS2</i>	143 (54.6%)	131 (60.4%)	0.202	1.268 (0.880-1.826)
<i>KIR2DS3</i>	76 (29.0%)	76 (35.0%)	0.159	1.319 (0.897-1.941)
<i>KIR2DS4</i>	255 (97.3%)	200 (92.2%)	<b>0.010</b>	<b>0.323 (0.131-0.794)</b>
<i>KIR2DS5</i>	76 (29.0%)	71 (32.7%)	0.381	1.190 (0.806-1.757)
<i>KIR2DP1</i>	253 (96.6%)	209 (96.3%)	0.882	0.929 (0.352-2.451)
<i>KIR3DP1</i>	262 (100%)	217 (100%)	---	---

Abreviaturas: **KIR**, Killer cell Immunoglobulin-like Receptors; **LMA**, Leucemia Mieloblástica Aguda; **OR**, Odd Ratio; 95% **IC**, Intervalo de confianza al 95%.

#### 4.3.2. Estudio de polimorfismos KIR y mortalidad en pacientes con LMA

El análisis comparativo de frecuencias fenotípicas de genes KIR inhibidores y activadores en la serie completa de pacientes LMA que han sobrevivido y pacientes *Exitus* no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Frecuencias fenotípicas de genes KIR en pacientes LMA fallecidos y vivos.

Genes KIR, n (%)	LMA Exitus (n=53)	LMA No Exitus (n=153)	P	OR (95% IC)
<i>KIR2DL1</i>	53 (100%)	147 (96.1%)	0.342	1.361 (1.252-1.479)
<i>KIR2DL2</i>	33 (62.3%)	91 (59.5%)	0.721	1.124 (0.591-2.137)
<i>KIR2DL3</i>	46 (86.8%)	136 (88.9%)	0.682	0.821 (0.320-2.106)
<i>KIR2DL4</i>	53 (100%)	152 (99.3%)	1.000	1.349 (1.244-1.462)
<i>KIR2DL5</i>	29 (54.7%)	92 (60.1%)	0.490	0.801 (0.427-1.505)
<i>KIR3DL1</i>	49 (92.5%)	142 (92.8%)	1.000	0.949 (0.289-3.118)
<i>KIR3DL2</i>	52 (98.1%)	153 (100%)	0.257	3.942 (3.117-4.986)
<i>KIR3DL3</i>	53 (100%)	153 (100%)	---	---
<i>KIR3DS1</i>	19 (35.8%)	59 (38.6%)	0.726	0.890 (0.465-1.704)
<i>KIR2DS1</i>	20 (37.7%)	62 (40.5%)	0.721	0.890 (0.468-1.691)
<i>KIR2DS2</i>	33 (62.3%)	90 (58.8%)	0.660	1.155 (0.608-2.195)
<i>KIR2DS3</i>	19 (35.8%)	54 (35.3%)	0.942	1.025 (0.534-1.966)
<i>KIR2DS4</i>	48 (90.6%)	142 (92.8%)	0.564	0.744 (0.246-2.249)
<i>KIR2DS5</i>	19 (35.8%)	48 (31.4%)	0.549	1.222 (0.634-2.358)
<i>KIR2DP1</i>	52 (98.1%)	146 (95.4%)	0.683	2.493 (0.300-20.751)
<i>KIR3DP1</i>	53 (100%)	153 (100%)	---	---

Abreviaturas: **KIR**, *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*; **LMA**, Leucemia Mieloblástica Aguda; **OR**, *Odd Ratio*; 95% **IC**, Intervalo de confianza al 95%.

## 5. DISCUSIÓN

Los sistemas HLA y KIR desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria asociada con el rechazo de injerto, reacción de injerto contra hospedador y supervivencia de pacientes trasplantados<sup>(35)</sup>. Por lo tanto, caracterizar la distribución alélica y haplotípica de los sistemas polimórficos HLA y KIR en pacientes con neoplasias hematológicas como la LMA es crucial para entender la posible influencia que estos grupos de genes puedan suponer con respecto a la SG de estos pacientes, además de poder seleccionar a los mejores candidatos a donante de progenitores hematopoyéticos. De este modo se podría mejorar el manejo de este grupo de pacientes por parte de los especialistas con la elección de tratamientos que aseguren una mayor SG en subgrupos de pacientes con mayor riesgo de mortalidad en función de la presencia o ausencia de un determinado gen HLA y/o KIR<sup>(35)</sup>.

Tras el análisis de frecuencias genotípicas HLA en la población de Castilla y León, se observó que los alelos más representados tanto en población sana como en pacientes LMA fueron los mismos; a saber, los alelos *HLA-A\*02:01*, *-B\*44:03*, *-C\*04:01*, *DRB1\*07:01* y *-DQB1\*03:01*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio están en concordancia con estudios previos llevados a cabo en el ámbito de la distribución de frecuencias HLA de baja y alta resolución tanto en la población española<sup>(34,36,37)</sup>, como en caucásicos europeos<sup>(38)</sup>. Recientemente, se han publicado las frecuencias genotípicas HLA de pacientes oncohematológicos con aloTPH en España por el grupo de Guerreiro *et al.*<sup>(35)</sup>. Los resultados obtenidos en nuestra población de pacientes LMA se encuentran en concordancia con dicho estudio, ya que los alelos más representados en en ambos grupos de son los mismos, con pequeñas excepciones, como el alelo *HLA-C\*04:01*, que se encuentra ligeramente más representado en nuestra cohorte. Los resultados obtenidos del grupo control con respecto a la caracterización genotípica HLA de alta resolución son los primeros de este tipo realizados en Castilla y León y servirán para realizar estudios caso-control de asociaciones a diferentes estados patológicos como otras enfermedades distintas a LMA o con proyectos en marcha por el mismo grupo relacionado con la infección por SARS-CoV-2.

En cuanto al análisis de las frecuencias haplotípicas HLA, el haplotipo más frecuente en pacientes LMA fue *HLA-A\*29:02~B\*44:03~C\*16:01~DRB1\*07:01~DQB1\*02:02* y en controles sanos fue *HLA-A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* de Castilla y León. Sin embargo, observamos diferencias en las asociaciones más frecuentes entre los alelos HL-B y -C de nuestra cohorte de pacientes LMA con respecto al trabajo de Guerreiro y colaboradores, siendo en su caso la asociación *B\*07:02~C\*07:02* la más frecuente. No así con respecto a las asociaciones en DRB1-DQB1 en donde hay concordancia de resultados entre



ambos trabajos, así como con los trabajos ya mencionados anteriormente <sup>(35,37)</sup>. Estas pequeñas diferencias pueden ser debidas a la diferente población utilizada, ya que en el caso de Guerreiro et al.<sup>(35)</sup> se utilizaron pacientes oncohematológicos de diferente tipo, no solo de LMA, y en nuestro caso todos los pacientes fueron diagnosticados de LMA.

Los alelos *HLA-C\*12:02* ( $P=0.001$ ,  $P_c=0.016$ ,  $OR=2.962$ ), *HLA-DRB1\*14:01* ( $P<0.001$ ,  $P_c=0.002$ ,  $OR=8.873$ ) y *HLA-DQB1\*06:01* ( $P=0.009$ ,  $P_c=0.045$ ,  $OR=2.560$ ) presentaron una frecuencia significativamente mayor en pacientes LMA comparado con controles sanos, indicando que estos genes podrían representar un factor de riesgo, aumentando la posibilidad de desarrollar LMA en la población positiva para estos alelos en 2.96, 8.87 y 2.56 veces más respectivamente. El desarrollo de LMA, sin embargo, es una enfermedad multigénica, necesitándose para su desarrollo la presencia de múltiples mutaciones y alteraciones cromosómicas, las cuales podrían verse potenciadas en individuos con ciertos genes HLA. En cuanto al gen *DRB1\*14:01* se han obtenido resultados concordantes con estudios previos en población china<sup>(39)</sup>. De manera menos significativa que los alelos ya citados, pero con cierta importancia, también se ha detectado este fenómeno en otros genes, como *HLA-B\*52:02* y *DRB1\*15:02* (Tabla 5). Resulta de gran interés clínico el hecho de que estos genes, a excepción del *HLA-A\*02:01* que no resultó significativo en este aspecto, se encuentran en un mismo haplotipo: *A\*02:01~B\*52:01~C\*12:02~DRB1\*15:02~DQB1\*06:01*. Este haplotipo también ha sido descrito en nuestra población de estudio, siendo frecuente en pacientes, pero no en la población de donantes. A partir de estos hechos relacionados y a pesar de no haber realizado un estudio comparativo de haplotipos entre pacientes LMA y controles sanos, este haplotipo puede ser de relevancia clínica, ya que los pacientes que posean esta combinación genética podrían tener un riesgo mayor de aparición de LMA. El *HLA-A\*02:01* se encuentra en este haplotipo ya que es muy frecuente<sup>(34,36)</sup>.

Las células NK y las interacciones de sus receptores con las células desarrollan un papel fundamental en la vigilancia antitumoral, por lo que la variabilidad génica de los receptores KIR puede explicar en cierta medida la diferencia entre pacientes LMA<sup>(40)</sup>. A partir de los resultados obtenidos en la comparativa de genes KIR entre pacientes LMA y controles sanos, se observó que los pacientes LMA presentaron una frecuencia significativamente inferior del gen *KIR2DS4* ( $P=0.01$ ,  $OR=0.323$ , 95% IC=0.131-0.794) comparado con el grupo control, indicando un posible papel protector de este gen KIR activador en población sana, teniendo los individuos que presenten dicho alelo un riesgo 3 veces menor de desarrollar LMA. Los ligandos descritos de *KIR2DS4* son el *HLA-C\*04:01* y *-C\*05:01*<sup>(41)</sup>. El alelo *HLA-C\*04:01* es el más representativo tanto en el grupo de pacientes



LMA como en controles sanos. El posible papel protector que *KIR2DS4* ejerza en la población podría deberse a la activación de las células NK tras reconocer *HLA-C\*04:01* en células malignas transformadas eliminándolas a través de mecanismos citotóxicos. No obstante, si pacientes con LMA presentan una menor frecuencia de este gen, podría existir una ventaja selectiva en estos por parte de los blastos mieloides transformados a escapar de la vigilancia tumoral por parte de las células NK. A pesar de que la importancia biológica de este receptor aún no ha sido elucidada con claridad, este hecho se encuentra en concordancia con otros estudios<sup>(42)</sup>, donde se destaca el papel protector del gen *KIR2DS4* en leucemia mieloide crónica. A la luz de los resultados obtenidos con respecto a *KIR2DS4*, es necesario profundizar en nuestros datos y poder elucidar el papel de *KIR2DS4* en el desarrollo de LMA.

La frecuencia de los distintos genes KIR individualmente no mostró diferencias significativas en los grupos de pacientes exitus y no exitus. Sin embargo, pacientes LMA del grupo exitus presentaron una frecuencia fenotípica significativamente superior para los alelos *HLA-B\*53:01* ( $P1=0.001$ ,  $P2=0.0003$ ,  $RR=3.695$ , 95%  $IC=1.813-7.529$ ), *HLA-C\*03:03* ( $P1=0.073$ ,  $P2=0.045$ ,  $RR=1.835$ , 95%  $IC=1.013-3.322$ ) y *HLA-DRB1\*11:01* ( $P1=0.031$ ,  $P2=0.031$ ,  $RR=1.855$ , 95%  $IC=1.058-3.2531$ ). Además, estos alelos se comportaron como factor de riesgo de mortalidad en pacientes LMA al suponer un incremento de la misma de 3.70, 1.84 y 1.86 respectivamente. La edad de los pacientes LMA también supuso un riesgo asociado con la mortalidad en nuestra serie de pacientes LMA, como ya había sido descrito en trabajos previos<sup>(43)</sup>. Todos estos factores superaron el análisis multivariante (P2), lo que indica su independencia como factores de riesgo asociados a mortalidad en LMA.

El hallazgo más significativo del presente Trabajo de Fin de Grado es sin duda la disminución, en nuestra serie, de la supervivencia global asociado a la presencia del alelo *HLA-B\*53:01* en pacientes LMA. La frecuencia del alelo *B\*53:01* en nuestra serie de pacientes fue del 2.1%, habiéndose observado en un 3.84% del total de los mismo ( $n=12$ ). El análisis de supervivencia Kaplan-Meier reveló un hallazgo que creemos tiene una alta relevancia clínica no descrita anteriormente por ningún otro estudio desde nuestro conocimiento en el tema; de modo que, al alcanzar los 5 años desde el diagnóstico de la enfermedad, ningún paciente que presente dicho alelo sobrevive, mientras que si lo hizo el 58.1% de pacientes negativos para *B\*53:01* (Figura 5, Log-Rank=0.000146). Estos hallazgos revelan que *HLA-B\*53:01* supone un factor de riesgo importante asociado con mortalidad de pacientes LMA, aunque es necesario profundizar en características clínicas, moleculares y citogenéticas, de respuesta al tratamiento en estos 12 pacientes *HLA-B\*53:01* para poder elucidar el papel biológico de este alelo. Por otro lado, confirmamos la edad como otro factor de riesgo importante asociado a mortalidad, de modo que la supervivencia global de pacientes

LMA >65 años fue del 21.6% a los 3 años de seguimiento frente al 65% en aquellos <65 años (Figura 6, Log-Rank=0.001). A pesar de esto, se observa que, durante el primer año desde el diagnóstico, la mortalidad en pacientes LMA fue independiente de la edad a pesar del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Esto puede ser relevante a la hora de monitorizar a pacientes más jóvenes diagnosticados de LMA para intentar mejorar la tasa de supervivencia en dicho grupo de edad.

A pesar de las posibles limitaciones que pueda tener nuestro estudio derivadas de la revisión de datos clínicos de forma retrospectiva, los hallazgos descritos con respecto a la alta tasa de mortalidad asociada con el alelo *HLA-B\*53:01* arrojan nuevos avances en el manejo de pacientes LMA al poder incluirse esta determinación de forma rutinaria, junto con las ya realizadas por parte del laboratorio de Biología Molecular y HLA del Servicio de Hematología de Salamanca, para poder monitorizar de una forma más individualizada a este grupo de pacientes de alto riesgo.

## 6. CONCLUSIONES

1. Se han obtenido las frecuencias alélicas, haplotípicas y fenotípicas para los genes HLA de clase I y clase II y KIR, destacando aquellos más representativos, en nuestra serie de pacientes diagnosticados de Leucemia Mieloblástica Aguda y donantes voluntarios REDMO de Castilla y León (España):
  - a. Los alelos HLA más frecuentes en tanto en pacientes LMA como controles fueron *HLA-A\*02:01*, *-B\*44:03*, *C\*04:01*, *-DRB1\*07:01* y *-DQB1\*02:01*
  - b. El haplotipo más frecuente en pacientes LMA fue: *A\*29:02~B\*44:03~C\*16:01~DRB1\*07:01~DQB1\*02:02* (2.7%).
  - c. El haplotipo más frecuente en donantes voluntarios del REDMO fue: *A\*01:01~B\*08:01~C\*07:01~DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (1,4%).
2. Los alelos *HLA-C\*12:02*, *HLA-DRB1\*14:01* y *HLA-DQB1\*06:01*, además del gen *KIR2DS4* actuaron como factores de riesgo en el desarrollo de LMA en nuestra serie de estudio. También se estableció que el haplotipo *A\*02:01~B\*52:01~C\*12:02~DRB1\*15:02~DQB1\*06:01* podría suponer un factor de riesgo de aparición de LMA.
3. Los alelos *HLA-B\*53:01*, *HLA-C\*03:03* y *HLA-DRB1\*11:01* y la edad fueron factores de riesgo independientes de mortalidad en nuestra serie de pacientes LMA.
4. Pacientes LMA *HLA-B\*53:01* positivos y los menores de 65 años presentaron una supervivencia global a los 3 y 5 años desde el diagnóstico significativamente inferior.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Blum, W., & Bloomfield, C. D. (2018). Leucemia mieloide aguda. In J. Jameson, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e Eds. J. Larry Jameson, et al. McGraw-Hill, 2018* (20th ed.)
2. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909–18.
3. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2017 Mar;129(12):1577–85.
4. Jonathan E Kolitz. Overview of acute myeloid leukemia in adults. *UptoDate.* 2019;10:1–19.
5. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Long DL, Loscalzo J. *Harrison. Principios de Medicina Interna.* 2021;
6. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.’ *Blood Cancer J.* 2016 Jul;6(7):e441–e441.
7. Schiffer CA, Anastasi J. Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of acute myeloid leukemia. *Uptodate.* 2016;1–21.
8. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 2005 Aug;104(4):788–93.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul;114(5):937–51.
10. Charles A Schiffer SG. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020;55(S1):1–4.
11. Cruz L. Leucemia Mielóide Aguda. *Rev Hematol.* 2018;19(1):24–40.
12. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan;129(4):424–47.
13. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jun;374(23):2209–21.
14. Oliveira GH de M, Júnior LSDS, Silva AEMOE, Lima JPA, Soares V lima, Freitas RV, et al. Clinical Utility of Flow Cytometry Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2019 Nov;134(Supplement\_1):5191–5191.
15. Pei X, Huang X. New approaches in allogeneic transplantation in AML. *Semin Hematol.* 2019 Apr;56(2):147–54.
16. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* 8th ed. Journal of Chemical Information and Modeling. 2015. 65–70 p.
17. Parham P. *The Inmune System.* 2015.
18. Monserrat Sanz J, García Torrijos C, Díaz Martín D, Prieto Martín A. Linfocitos natural killer. *Med.* 2013;11(28):1728–36.
19. Cooley S, Parham P, Miller JS. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2018;131(10):1053–62.
20. Muro M, López-Hernández R, Llorente S, Bolarin JM, Martínez P, Boix F, et al. MICA Molecules in Disease and Transplantation, a Double-Edged Sword? *Curr Immunol Rev.* 2012;8(4).
21. Liu H, Wang S, Xin J, Wang J, Yao C, Zhang Z. Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2019;10:2064–78.
22. Trowsdale J. Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes HLA class I and NK receptors are encoded within. *Immunity.* 2001;15:363–74.
23. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: Lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2011;132(3):315–25.
24. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217–51.
25. Weisdorf D, Cooley S, Wang T, Trachtenberg E, Vierra-Green C, Spellman S, et al. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv.* 2020 Feb;4(4):740–54.
26. Bultitude WP, Schellekens J, Szydlo RM, Anthias C, Cooley SA, Miller JS, et al. Presence of donor-encoded centromeric KIR B content increases the risk of infectious mortality in recipients of myeloablative, T-cell deplete, HLA-matched HCT to treat AML. *Bone Marrow Transplant.* 2020 Oct;55(10):1975–84.
27. Sobecks RM, Wang T, Askar M, Gallagher MM, Haagenson M, Spellman S, et al. Impact of KIR and HLA Genotypes on Outcomes after Reduced-Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Sep;21(9):1589–96.
28. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* In: *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2015. p. 219–34.
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* In 2015. p. 112–40.

30. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. INMUNOLOGIA de Kubly. Jano: Medicina y humanidades. 1972. 3–4 p.
31. Amador MM, Moya-Quiles MR, Álvarez-López MR. Capítulo 39. HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL TRASPLANTE. :1–13.
32. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM. Clinical immunology: Principles and practice: Fourth edition. Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition. 2012. 1–1295 p.
33. Sayegh MH, Riella L V., Chandraker A. 71 - Inmunobiología del trasplante. Tenth Edit. Brenner y Rector. El riñón. Elsevier Espa8#241;a, S.L.U.; 2020. 2227–2250 p.
34. Boix F, Marín-Rubio LA, Alcoceba M, García-Álvarez M, Chillón MC, García-Sánchez S, et al. Allele and haplotype frequencies of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DQA1 in Castile and Leon region from North West of Spain. Hum Immunol. 2021;(online):4–5.
35. Guerreiro M, Planelles D, Aguilar-Gallardo C, Lorenzo JI, Montoro J, Sanz J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in Spain: Human leukocyte antigen characteristics and diversity by high-resolution analysis. Hla. 2021;97(3):198–213.
36. Alcoceba M, Marín L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Chillón MC, Martín-Jiménez P, et al. Frequency of HLA-A, -B and -DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y León (northwest-central Spain). Tissue Antigens. 2011;78(4):249–55.
37. Montero-Martín G, Mallempati KC, Gangavarapu S, Sánchez-Gordo F, Herrero-Mata MJ, Balas A, et al. High-resolution characterization of allelic and haplotypic HLA frequency distribution in a Spanish population using high-throughput next-generation sequencing. Hum Immunol. 2019;80(7):429–36.
38. Lucas JAM, Hayhurst JD, Turner TR, Gymer AW, Leen G, Robinson J, et al. Single molecule real-time DNA sequencing of the full HLA-E gene for 212 reference cell lines. Hla. 2020;95(6):561–72.
39. Zhou M, Qiu H, Chen T, Xiao R, Yang J, Cen L, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1\*14 is associated with a high incidence of acute lymphocytic leukemia. Onkologie. 2012;35(5):268–71.
40. Martínez-Sánchez MV, Fuster JL, Campillo JA, Galera AM, Bermúdez-Cortés M, Llinares ME, et al. Expression of nk cell receptor ligands on leukemic cells is associated with the outcome of childhood acute leukemia. Cancers (Basel). 2021;13(10):1–20.
41. Parham P. A natural killer cell receptor takes sharp aim at the world of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(26):12601–3.
42. Giebel S, Nowak I, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Holowiecki J, Kyrz-Krzemien S, et al. Association of KIR2DS4 and its variant KIR1D with leukemia. Leukemia. 2008;22(11):2129–30.
43. Yi M, Li A, Zhou L, Chu Q, Song Y, Wu K, et al. The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: Estimates based on the global burden of disease study 2017. J Hematol Oncol. 2020;13(1):1–16.